

IDENTIFIKASI SENYAWA DARI EKSTRAK PETROLEUM ETHER KALUS
SIRIH MERAH (*Piper Crocatum* Ruiz dan Pav.)

Junairiah, Budi Utomo, Y. Sri Wulan Manuhara

Prodi S-1 Biologi, Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Airlangga, Surabaya

Abstract

*The objective of this study was to identify the compounds contained in the petroleum ether extract of the callus of red betel (**Piper crocatum Ruiz and Pav.**) using Gas Chromatography-Mass Spectroscopy (GC-MS). The *in vitro* culture of the callus of red betel (*Piper crocatum*) was done by incubated the pieces of the red betel leaf explants that were sterilized with a solution of detergent, baycline and alcohol 75% before on MS medium supplemented with NAA and kinetin 3 ppm 0.5 ppm for 2 months the culture period. The callus that were formed during the incubation period were dried in a temperature over 50° C. The dried callus then crushed in porcelain cup using a mortar until it become a powder. The powder that were obtained then extracted with petroleum ether solvent by using maceration method for 1 day. Once macerated, the callus extract were filtered with a filter paper. The pulp that were left during first maceration were later macerated again with the same solvent and then filtered again. If the extract is still concentrated, the maceration step is repeated for the third time. The profile chromatogram result of the petroleum ether extract of red betel leaf callus showed 15 peaks. The peaks are the representative of the number of compounds detected on the GC. The 15 peaks then later analyzed by using Mass Spectroscopy (MS) to determine the molecular weight or relative mass based on the pattern of the fragmentation. Of all the compounds that were found, the 3 largest component were hexadecanoic acid with a retention time of 11.66 minutes and 35.70% of the area, 3- (3'-butenyl) Cyclohexanone with a retention time of 08.38 minutes and 12.56% of the area , Dimethylamphetamine with a retention time of 08.05 minutes and 9.85% of the area.*

Keywords: compound identification, GC-MS, Piper crocatum, petroleum ether extract.

Pendahuluan

Indonesia adalah salah satu negara yang memiliki keanekaragaman hayati, terutama dalam sumber daya hutan tropisnya yang sebagian besar berkhasiat sebagai bahan obat alam dan obat tradisional (Supriyadi, 2001). Tumbuh-tumbuhan mempunyai peranan yang sangat besar dalam bidang kesehatan karena tumbuhan dapat memproduksi zat-zat kimia yang mempunyai kegunaan potensial dalam pengobatan. Data menyebutkan ada 50% dari obat-obat yang beredar di negara industri berasal dari tanaman (Indrayanto dan Rahman, 1990).

Tanaman obat banyak digunakan, baik di bidang kosmetik maupun obat-obatan. Tanaman obat masih tetap dipelajari tidak hanya tradisi, tetapi terutama nilainya di bidang farmasi. Tanaman yang bermanfaat dalam pengobatan tradisional kemudian diteliti secara ilmiah untuk dibuktikan aktifitas teraupetikanya, setelah terbukti berkhasiat kemudian dikembangkan menjadi suatu bentuk sediaan obat (Heyne, 1987). Kurang lebih ada 30 bahan obat-obatan yang merupakan produk metabolit sekunder dari tanaman, bermanfaat dalam dunia kedokteran modern. Hampir 1500 senyawa baru yang tiap tahun diisolasi dari tanaman, 20% diantaranya mempunyai aktifitas biologis tertentu (Indrayanto, 1987). Kebanyakan produk metabolit sekunder diisolasi dari tanaman, namun banyak keterbatasan dari sumber bahan baku sehingga dipilih teknik kultur sebagai perbanyak tanaman. Teknik kultur jaringan tanaman dalam bidang farmasi memiliki manfaat yang besar, karena dapat menghasilkan metabolit sekunder untuk upaya pembuatan obat-obatan yaitu dengan memisahkan unsur-unsur yang terdapat dalam kalus maupun protokormus misalnya alkaloid, steroid, dan terpenoid (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Syarat minimal dalam pembuatan kultur jaringan tanaman adalah menyediakan media yang sesuai baik komposisi maupun kadar untuk makro dan mikro, gula, vitamin, senyawa organik dan asam amino. Eksplan akan tumbuh lebih baik apabila dirangsang dengan zat pengatur tumbuh. Zat pengatur tumbuh merupakan suatu senyawa yang sangat penting dalam pertumbuhan tanaman (Tabata 1977). Penambahan zat pengatur tumbuh berupa hormon sitokinin seperti kinetin dan *Furfuril Amino Purin* (FAP) kadang dibutuhkan bersama-sama auksin seperti *2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid* (2,4-D) atau *Naphthalene Acetic Acid* (NAA) untuk mendapatkan pembentukan kalus yang baik (Abidin 1989). Pembentukan dan pertumbuhan kalus yang baik dapat diperoleh dengan cara penambahan zat pengatur tumbuh dengan perbandingan yang sesuai dan tepat dari zat-zat tersebut (Hendaryono dan Wijayani 1994).

Sirih merah (*Piper crocatum*) merupakan jenis sirih yang banyak dimanfaatkan sebagai tanaman hias pada tahun 1900-an namun sekarang mengalami perubahan fungsi menjadi tanaman obat sejak dikenalkan oleh Bambang Sudewo, seorang produsen tanaman

obat di Blunyahrejo (Duryatmo, 2005). Tanaman sirih merah (gambar 1) tumbuh menjalar seperti sirih hijau, batangnya bersulur dan beruas dengan setiap buku tumbuh bakal akar, daunnya bertangkai membentuk jantung dengan bagian atas meruncing, mempunyai warna yang khas yaitu permukaan atas hijau gelap berpadu dengan tulang daun berwarna merah hati keunguan, daun berasa pahit, berlendir, serta mempunyai bau yang khas seperti sirih (Duryatmo, 2005).



Gambar 1. Morfologi sirih merah (*Piper crocatum*) (Duryatmo, 2005).

Uji aktivitas antibakteri famili Piperaceae telah banyak dilakukan. Berdasarkan penelitian Arambewela (2005), minyak atsiri daun sirih (*Piper betel*) dari Srilanka mempunyai nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) yaitu sebesar $5,00 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$ terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Minyak atsiri daun sirih pada konsentrasi 50%, 25%, 12,5% dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Streptococcus agalactiae*, tetapi hanya dapat menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 25% dan 50% (Poeloengan, 2006). Ekstrak etanol sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz dan Pav) mempunyai kemampuan antibakteri terhadap bakteri gram positif dan bakteri gram negatif khususnya terhadap *Staphylococcus aureus* dengan KHM 25% dan *Escherichia coli* dengan KHM 6,25% (Juliantina, dkk., 2009).

Menurut Solichah (2009), secara empiris sirih merah digunakan sebagai obat kencing manis, ambeien, meredakan peradangan, kanker, asam urat, darah tinggi, hepatitis, kelelahan dan sakit maag. Senyawa fitokimia yang terkandung dalam daun sirih merah meliputi alkaloid, saponin, tannin, dan flavonoid (Sudewo, 2008). Flavonoid bekerja menghambat fase

penting dalam biosintesis prostaglandin, yaitu pada lintasan siklooksigenase. Flavonoid juga menghambat fosfodiesterase, aldoreduktase, monoamine oksidase, protein kinase, DNA polymerase dan lipooksigenase (Robinson, 1995). Tanin diketahui mempunyai aktifitas antiinflamasi, astringen, antidiare, diuretik dan antiseptik (Khanbabaee dan Ree, 2001). Saponin memiliki berat molekul tinggi, dan berdasarkan struktur aglikonnya, Sholikhah (2006) menyatakan bahwa saponin dapat dipakai sebagai antimikroba. Sedangkan aktivitas farmakologi saponin yang telah dilaporkan antara lain sebagai antiinflamasi, antibiotik, antifungi, antivirus, hepatoprotektor serta antiulcer (Gunawan dan Mulyani, 2004).

Berdasarkan dari kenyataan tersebut diatas maka dilakukan suatu penelitian mengenai pemeriksaan senyawa minyak atsiri pada ekstrak *petroleum eter* kalus daun sirih merah yang dikultur pada medium *Murashige dan Skoog* (MS) dengan penambahan zat pengatur tumbuh *Naphthalene Acetic Acid* (NAA) 3 ppm dan kinetin 0,5 ppm untuk memperoleh berat kering kalus yang tinggi.

Metode Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Departemen Biologi Fakultas Saint dan Teknologi Universitas Airlangga Surabaya dan berlangsung selama 8 bulan, dimulai pada bulan Januari hingga Agustus 2015.

Bahan tanaman yang digunakan sebagai eksplan adalah potongan organ daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz and Pav.) yang masih muda (kedua dan ketiga dari pucuk). Bahan kimia yang digunakan meliputi media dasar *Murashige dan Skoog* (MS), *Naphthalene Acetic acid* (NAA) 3 ppm dan kinetin 0,5 ppm. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi kalus sirih merah (*P. crocatum*) adalah *petroleum eter*.

Alat yang digunakan adalah botol kultur, LAF (*Laminar Air Flow*), autoklaf, alat-alat kultur jaringan tumbuhan, gelas beaker, gelas ukur.

Kultur kalus sirih merah (*Piper crocatum*) secara *in vitro* dilakukan dengan cara menginkubasi potongan eksplan daun sirih merah yang telah disterilisasi dengan larutan detergen, *baycline* dan alkohol 75 % pada media MS yang ditambahkan dengan NAA 3 ppm dan kinetin 0,5 ppm selama 2 bulan masa kultur.

Kalus yang terbentuk dari eksplan daun sirih merah selama masa inkubasi dikeringkan dalam oven bersuhu 50° C. Kalus sirih merah yang kering digerus di dalam cawan porselin menggunakan mortar hingga menjadi serbuk. Serbuk yang diperoleh kemudian diekstraksi dengan metode maserasi dengan pelarut *petroleum eter* selama 1 hari. Setelah dimaserasi ekstrak kalus disaring dengan kertas saring. Ampas kalus kemudian dimaserasi kembali

dengan pelarut yang sama dan kemudian disaring kembali. Apabila hasil saringan masih pekat langkah maserasi diulang kembali untuk yang ketiga kalinya.

Metode *Gas Chromatography-Mass Spectroscopy* (GC-MS) digunakan untuk identifikasi senyawa minyak atsiri ekstrak *petroleum eter* kalus daun sirih merah. GC-MS merupakan perpaduan dari kromatografi gas dan spektroskopi massa. Senyawa yang telah dipisahkan oleh kromatografi gas, selanjutnya dideteksi atau dianalisis menggunakan spektroskopi massa. Pada GC-MS aliran dari kolom terhubung secara langsung pada ruang ionisasi spektrometer massa. Pada ruang ionisasi semua molekul (termasuk gas pembawa, pelarut, dan solut) akan terionisasi, dan ion dipisahkan berdasarkan massa dan rasio muatannya. Setiap solut mengalami fragmentasi yang khas (karakteristik) menjadi ion yang lebih kecil, sehingga spektra massa yang terbentuk dapat digunakan untuk mengidentifikasi solut secara kualitatif (Harvey, 2000).

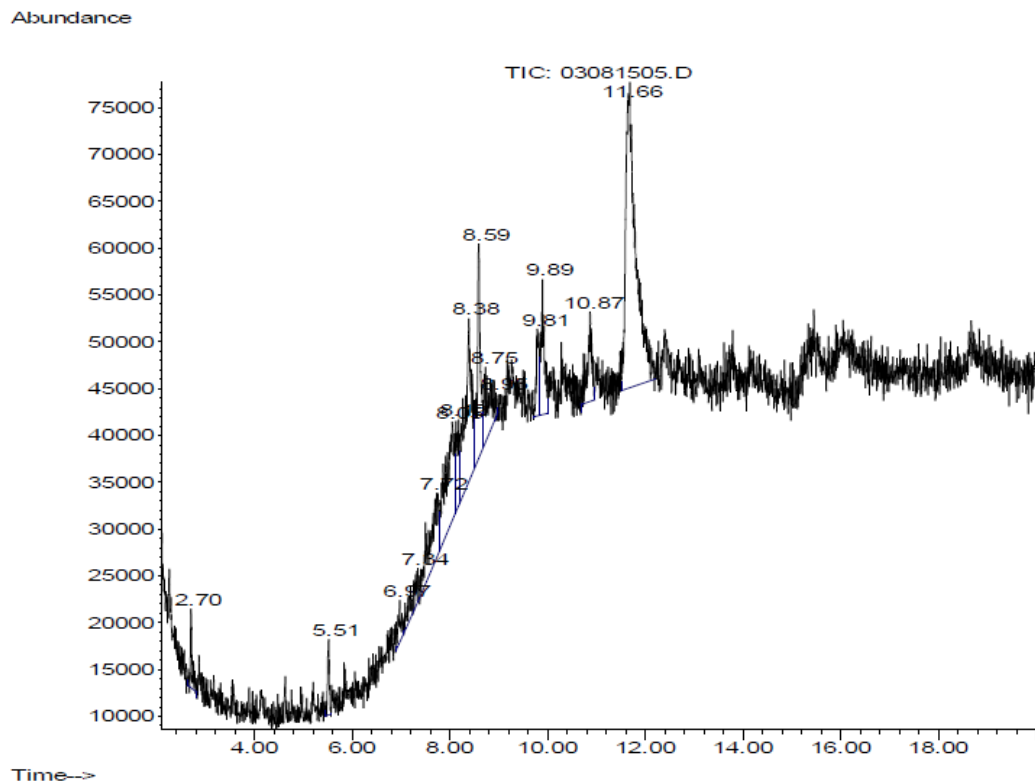
Hasil dan Pembahasan

Analisis fitokimia (GC-MS) merupakan salah satu langkah penting dalam upaya mengungkap potensi sumber daya tumbuhan. Hasil analisis fitokimia dapat memberikan petunjuk tentang keberadaan komponen metabolit sekunder pada tumbuhan.

Ekstraksi kalus sirih merah pada penelitian ini menggunakan pelarut *petroleum eter*, karena didasarkan pada kelarutan komponen terhadap komponen lain dalam campuran. Komponen minyak atsiri bersifat non polar sehingga dipilih pelarut yang juga bersifat non polar. Titik didih yang rendah juga merupakan salah satu alasan dipilihnya *petroleum eter* menjadi pelarut. Selain itu pada penelitian Amiarsi dan Sabari (2006) digunakan pelarut *petroleum eter*, secara visual menghasilkan absolute mawar yang terang dan jernih. Pada penelitian Edris *et al.* (2008) dan Khoddami *et al.* (2011) yang mengacu kepada ekstraksi minyak atsiri digunakan pelarut heksan dan *petroleum eter*, dan akurasi lama waktu yang digunakan berpengaruh terhadap efisiensi proses.

Analisis dengan GC-MS dibedakan dua bagian, yaitu bagian pertama pengukuran dengan GC untuk memisahkan komponen-komponen kimia dalam sampel, sedangkan bagian kedua pengukuran dengan *Mass Spectroscopy* (MS) untuk menentukan bobot molekul atau massa relatif berdasarkan pola fragmentasinya.

Analisis senyawa minyak atsiri ekstrak *petroleum eter* kalus daun sirih merah dengan *Gas Chromatography* (GC) menghasilkan profil kromatogram seperti dalam gambar 2, yang terdiri dari beberapa komponen dengan waktu retensi yang berbeda-beda.



Gambar 2. Profil kromatogram ekstrak *petroleum eter* kalus daun sirih merah.

Profil kromatogram dari ekstrak *petroleum eter* kalus daun sirih merah menunjukkan 15 puncak. 15 puncak yang diperoleh merupakan perwakilan dari jumlah senyawa yang dapat terdeteksi pada bagian GC. 15 puncak tersebut selanjutnya dianalisis dengan tahap ke dua yaitu pengukuran dengan *Mass Spectroscopy* (MS) untuk menentukan bobot molekul atau massa relatif berdasarkan pola fragmentasinya. Berdasarkan pengukuran dengan MS, berat molekul 15 puncak tersebut dicocokkan dengan pustaka NIST02.L dan Wiley277.L. Hasil identifikasi 15 puncak senyawa dari ekstrak *petroleum eter* kalus daun sirih merah dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil identifikasi senyawa dari ekstrak *petroleum eter* kalus daun sirih merah.

No.	Waktu retensi (menit)	% Luas Area	Nama Senyawa
1	2,70	1,69	<i>Butanal</i>
2	5,51	1,60	<i>Cyclohexane</i>
3	6,97	1,42	<i>Tetrahydrocyclopentadienone</i>
4	7,34	2,53	<i>Methyl ester of decyclotrenudin</i>
5	7,72	6,68	<i>Dimer of Coleon</i>
6	8,05	9,85	<i>Dimethylamphetamine</i>
7	8,12	2,78	<i>2,4(1H,3H)-Pyrimidinedione</i>
8	8,38	12,56	<i>3-(3'-butenyl)cyclohexanone</i>
9	8,59	8,10	<i>1-vinyl-1-cyclopropyl methyl ether</i>

10	8,75	4,11	<i>1-Dotriacontanol</i>
11	8,95	0,23	<i>7-Hydroxy-3-(1,1-dimethylprop-2</i>
12	9,81	2,92	<i>1,2-Epoxy-1-vinylcyclododecene</i>
13	9,89	5,01	<i>1-Hentetracontanol</i>
14	10,87	4,84	<i>HAHNFETT</i>
15	11,66	35,70	<i>Hexadecanoic acid</i>

Berdasarkan tabel 1, ekstrak *petroleum eter* kalus daun sirih merah mengandung 15 komponen senyawa. Dari semua komponen senyawa tersebut, 3 komponen terbesar adalah *Hexadecanoic acid* dengan waktu retensi 11,66 menit dan luas area 35,70 %, *3-(3'-butenyl)cyclohexanone* dengan waktu retensi 08,38 menit dan luas area 12,56 %, *Dimethylamphetamine* dengan waktu retensi 08,05 menit dan luas area 9,85 %.

Konovalova *et al.* (2013) melaporkan bahwa analisis GC-MS daun *Shepherdia argentea* (Pursh.) Nutt. mengungkapkan kehadiran dari *n-hexadecanoic acid*. senyawa ini juga merupakan komponen bioaktif dari *Hugonia mystax* L. (Linaceae) (Rajeswari *et al.*, 2012). Senyawa ini dimungkinkan memiliki peran dalam efek antioksidan, hipokolesterolemik dan anti-inflamasi (Yogeswari *et al.*, 2012; Mihailovi *et al.*, 2011).

3-(3'-butenyl)cyclohexanone (keton siklik) juga terdeteksi pada minyak esensial yang diekstrak dari pohon palem kerdil (*Chamaerops humilis* L.) (Said *et al.*, 2013), minyak esensial dari ekstrak daun *Rose geranium* (P. cv. Rose) (Dyubeni *et al.*, 2012). *cyclohexanone* digunakan sebagai pelarut non-polar untuk industri kimia, dan juga sebagai bahan baku untuk produksi industri asam adipat dan kaprolaktam, yang keduanya intermediet digunakan dalam produksi nilon (Wikipedia Foundation, 2009).

Dimethylamphetamine juga terdeteksi pada ekstrak etanol *Salacia oblonga* Wall (Musini *et al.*, 2013), minyak esensial dari ekstrak daun *Cinnamomun burmannii*. Ekstrak dari daun *Cinnamomun burmannii* dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan (Chen *et al.*, 2011).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, dapat diambil kesimpulan sebagai berikut.

1. Ekstrak *petroleum eter* kalus daun sirih merah mengandung 15 komponen senyawa.
2. 3 komponen terbesar adalah *Hexadecanoic acid* dengan waktu retensi 11,66 menit dan luas area 35,70 %, *3-(3'-butenyl)cyclohexanone* dengan waktu retensi 08,38 menit dan luas area 12,56 %, *Dimethylamphetamine* dengan waktu retensi 08,05 menit dan luas area 9,85 %.

Daftar Pustaka

- Amiarsi, Y., dan Sabari, 2006, Pengaruh Jenis dan Perbandingan Pelarut terhadap Hasil Ekstraksi Minyak Atsiri Mawar, *Jurnal Hortikultura*, **16(4):356-359**.
- Arambawela, L., 2005, Studies on Piper betle of Srilanka, *J. Natn. Sci.*, Foundation Sri Lanka, **Vol. 33(2):133-139**
- Chen, L., Jianyu Su, Lin Li, Bing Li, and Wang L., 2011, A new source of natural D-borneol and its characteristic, *Medicinal Plants Research* **Vol. 5(15), pp. 3440-3447**
- Duryatmo, S., 2005, Sirih Merah Tolak Amputasi, <http://www.dipertajatim.go.id>. Tanggal Akses 1 Januari 2012
- Dyubeni L., B. Mayekiso and M. L. Magwa, 2012, A comparative study on essential oil yield and composition of *rose-scented geranium* (P. c. v. Rose) commercially grown on three different sites of the Amathole region in the Eastern Cape, South Africa, *African Journal of Agricultural Research* **Vol. 7(43), pp. 5842-5848**
- Edris, A. E., R. Chizzola, and C. Franz, 2008, Isolation and Characterization of the Volatile Aroma Compounds from the Concrete Headspace and the Abdolute of *Jasminum sambac* (L.) Ait. (Oleaceae) Flowers Grown in Egypt. *European Food Research Technology* **226:621-626**.
- Gunawan, D., dan Sri Mulyani, 2004, *Ilmu Obat Alam*, Penebar swadaya, Jakarta; **107, 115-116**
- Harvey, D., 2000, *Modern Analytical Chemistry*, McGraw-Hill, New York
- Heyne, K., 1987, *Tumbuhan Berguna Indonesia, Jilid 3*, Departemen Kehutanan, Jakarta
- Hendaryono D, Wijayani A. 1994. *Teknik Kultur Jaringan*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius. **Hal 118**
- Indrayanto G., dan Rahman A., 1990, Prospek bioteknologi sel tanaman untuk produksi bahan obat nabati secara *In Vitro*, *Medika Jurnal Kedokteran dan Farmasi*, **Hal 45**
- Indrayanto G., 1987, *Produksi Metabolit Sekunder dengan Teknik Kultur Jaringan Tanaman*, Seminar Nasional, Pusat Antar Universitas, Yogyakarta: Universitas Gajah Mada, **Hlm 9-11**
- Juliantina, R., Farida, Dewa A. C., Bunga N., Titia N., dan Endarwati T. B., 2009, Manfaat Sirih Merah (*Piper crocatum*) Sebagai Agen Anti Bakterial terhadap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif, *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*
- Khanbabaee, K. dan Ree, TV, 2001, Tannins: Classification and Definition, *Nat Prod Rep*, **18: 641-649**

- Khoddami, A., H. M. Ghazali, A. Yassoralipour, Y. Ramakrishnan, and A. Ganjloo, 2011, Physicochemical Characteristic of Nigella Seed (*Nigella sativa* L.) Oil as Affected by Different Extraction Methods, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **Vol 88:533-540**
- Mihailovi, V., Vukovi N., Niforovi N., Soluji S., Mladenovi M., Maškovi P., 2011, Studies on the antimicrobial activity and chemical composition of the essential oils and alcoholic extracts of *Gentiana asclepiadea* L., *J Med Plant Res*, **Vol 5(7): 1164-1174**
- Poeloengan, Masniari, 2006, Aktivitas Air Perasan, Minyak Atsiri dan Ekstrak Etanol daun sirih Terhadap Bakteri yang Diisolasi dari Sapi Mastitis Subklinis, *Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*, Jakarta
- Rajeswari, G., M. Murugan, and VR. Mohan, 2012, GC-MS analysis of bioactive components of *Hugonia mystax* L. (Linaceae), *Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, **Vol 67 0975-8585**
- Robinson, T., 1995, *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*, hal. 191-196, 209, ITB, Bandung
- Säid, K., Essaqui A., M'bark H., Mohamed B., 2013, Chemical composition of the essential oil extracted from the leaves of the dwarfish (*Chamaerops humilis* L.) palm tree of Morocco (Region of Benslimane), *Applied Pharmaceutical Science*, **Vol. 3 (08), pp. 113-115**
- Sholikhah, A., Sirih Merah Menurunkan Glukosa Darah, <http://www.pustakatani>, Tanggal akses 20 Agustus 2006
- Solichah, M., 2009, Identifikasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Secang (*Caesalpinia sappan* (L)), *Skripsi*, Surakarta, FMIPA UNS
- Sudewo, B., 2008, *Basmi Penyakit Dengan Sirih Merah*, Cetakan kedua, Agro Media Pustaka, Jakarta
- Supriyadi, 2001, *Tumbuhan Obat Indonesia, Penggunaan dan Khasiat*, Edisi I, Jakarta: Populer Obor, **Hal ix**
- Yogeswari S., Ramalakshmi S., Neelavathy R., Muthumary J., 2012, Identification and Comparative Studies of Different Volatile Fractions from *Monochaetia kansensis* by GCMS, *Global J Pharm*, **Vol 6 (2): 65-71**
- Wikipedia Foundation, 2009, www.wikipedia.com