

Di Sela-Sela Kegiatan Laboratorium, Plot Eksperimen dan Penelitian Lapangan:

IDENTIFIKASI SECARA CEPAT BAHAN BIOAKTIF PADA TUMBUHAN DI LAPANGAN

[Rapid Identification of Bioactive Compounds in Plants in The Field]

Chairul

Laboratorium Fitokimia, Bidang Botani-Puslit Biologi LIPI, Bogor

ABSTRACT

New drug discovery from natural products (bio-prospecting) is not an easy works and takes time, big budget, human resources etc. Some important approaches must be taken in order to get success. A preliminary observation of biologically active components is important approach in order that more selective in collecting research materials in the field. This approach is purposed to facilitate (make easier) the next steps research process later in the laboratory level.

Several methods of preliminary observation of biologically active components had been carried out in the field, but the general guideline of fast observation had been used e.g. 1). Etno-botany (Etnomedicine dan Etnopharmacology), 2). Chemotaxonomy, 3). Organoleptic, 4) Chemical (reagent kit) and 5). Simple bioassay in the field (fish poison test, insecticide). Besides that collecting the herbarium specimen as well as research materials for any scientific and laboratory works.

This paper describes these approaches in order to make useful methods to researchers, who go to the field and they could collect more selective research materials before bring them to laboratory.

Kata kunci/ Key words: Observasi awal/Preliminary observation, komponen aktif biologi/biologically active components, uji cepat/fast test, kerja lapangan/fieldwork.

PENDAHULUAN

Pemanfaatan keanekaragaman hayati (*bioprospecting*) sangat besar sekali, menurut catatan World Health Organization (WHO), diperkirakan hampir 80% dari umat manusia terutama di negara-negara sedang berkembang masih bergantungkan dirinya pada tumbuh-tumbuhan (ekstrak dan bahan aktif biologi) sebagai bahan obat dan memelihara kesehatannya (Farnsworth *et al.* 1985). Berbagai produk bioprospektif seperti, obat tradisional (*herbal medicine, homeopathy, aromatherapy*), kosmetika, minuman/makanan tambahan (*food supplement*) telah beredar dimasyarakat mulai dari pedagang kaki lima sampai di supermarket (Janoff, 1999; Sunno, 1999; Anonymous, 2000; Rees & Weil, 2001).

Keberhasilan penelitian dan pengembangan bahan-bahan tersebut diawali dengan identifikasi bahan aktif biologi yang secara potensial mempunyai aktivitas biologis yang berguna. Setiap jenis (*species*) yang ada di darat maupun dilaut menghasilkan beranekaragam bahan-bahan kimia (*chemical prospecting*). Jadi setiap jenis memiliki nilai-nilai kimiawi yang dapat diartikan bahwa

keanekaragaman hayati merupakan keanekaragaman kimia (*chemodiversity*) Setiap jenis dari keanekaragaman hayati merupakan laboratorium alam yang tersibuk di dunia, dimana setiap detiknya menghasilkan satu atau lebih bahan kimia dari berbagai tipe dan jenis yang berguna untuk menunjang kelangsungan hidup organisme tersebut seperti, glukosa, asam amino, protein dan vitamin (metabolik primer) atau untuk melindungi diri, berkembang biak dan lain sebagainya seperti, senyawa alkaloida, fenolik, flavonoida, glikosida, minyak atsiri, terpenoida dan lain-lainnya (metabolik sekunder). Tipe dan jenis bahan kimia yang dihasilkan untuk setiap jenis tidaklah sama tergantung pada jenis dari organisme atau kekerabatannya (taksa). Jadi setiap jenis tumbuhan menghasil bahan kimia alam yang spesifik tergantung dari taksanya dan setiap bahan kimia tersebut akan mempunyai fungsi tertentu dalam metabolik organisme tersebut, beberapa diantaranya dapat mempengaruhi fungsi fisiologik manusia dan organisme lainnya, inilah yang disebut dengan senyawa-senyawa aktif biologi (*biologically active compounds*)(Chairul, 2000).

Untuk mengetahui keberadaan bahan aktif biologi yang terkandung di dalam suatu bahan alam diperlukan pendekatan-pendekatan awal dimulai dari kegiatan atau penelitian lapangan agar supaya pengumpulan bahan-bahan yang akan diteliti lebih selektif untuk mendapat bahan yang terpilih (bukan sampah). Pendekatan ini bertujuan untuk memudahkan proses analisis selanjutnya. Berbagai metoda telah digunakan untuk kegiatan lapangan, tetapi pada garis besarnya dilakukan beberapa pendekatan antara lain; secara 1) etnobotani (*etnomedicine* dan *etnopharmacology*), 2) kemotaksonomi (*chemotaxonomy*), 3) uji rasa (*organoleptic*), 4) pendekatan kimiawi menggunakan pereaksi (*reagent kit*) yang telah dipersiapkan untuk pengujian golongan bahan-bahan aktif biologi tertentu, 5) uji aktivitas biologi (*bioesai*) secara cepat dilapangan.

Disamping itu koleksi spesimen herbarium maupun material tumbuhan perlu diambil atau dikumpulkan untuk proses lebih lanjut maupun kajian ilmiah lainnya di laboratorium.

ETNOBOTANI

Seperti yang telah disebutkan sebelumnya bahwa keanekaragaman hayati adalah pusat dari semua sektor yang penting bagi kehidupan manusia. Tumbuh-tumbuhan merupakan sumber daya alam (SDA) yang paling banyak digunakan dalam budaya dan kepentingan manusia dibandingkan SDA lainnya, hal ini disebabkan adanya interaksi langsung antara manusia dengan tumbuhan melalui pendayagunaan atau produknya bagi kelangsungan hidup manusia, antara lain sebagai bahan pangan, papan, sandang dan obat-obatan (Farnsworth, 1990).

Prasasti pemberdayaan tumbuhan sebagai obat tradisional dijumpai pada fosil yang terdapat pada suatu gua di Texas dan ditulis oleh suku Indian-Amerika lebih kurang tahun 7000 SM yaitu, peyote (*Lophophora willamsii*) sejenis kaktus yang mengandung bahan aktif biologi yang bersifat halusigenik yaitu, tubokurarin. Pada artifak di pesisir Ekuador Amerika Selatan menunjukkan bahwa coca (*Erythroxylon* spp.) telah digunakan sebagai halusigenik pada tahun 2100 SM. Sedangkan suku Indian Maya dan Aztec telah menggunakan jamur (*Psilocybe* spp.) sebagai halusigenik dalam acara ritual

keagamaannya. Charles-Marie de la Condamine selama ekspedisinya ke Ekuador telah menyelusuri sungai Amazon dan menjumpai peninggalan etnobotani antara lain, karet (*Havea*), ipecac (*Cephalis*), kina (*Cinchona*) dan kurare (diduga *Strychnos*) (Mills & Bone, 2000). Pada kebudayaan Timur (Hindu dan China) ditemukan juga beberapa cara pengobatan tradisional dan salah satunya adalah pemberdayaan tumbuhan yang terdapat pada kitab suci Hindu khususnya untuk pengobatan yaitu, "Aryurvedic". Di dalam veda tersebut tertulis tumbuhan "sarpagandha" (*Rauwolfia serpentina*) yang mengandung bahan aktif biologi alkaloida reserpina untuk pengobatan hipertensi (Dash, 1995). Dalam kitab pengobatan Cina kuno "Peu Ts'ao Ching", yang diterbitkan pada tahun 3000 SM, menyebutkan tumbuhan obat tradisional yaitu, "yin-sing" (*Ginko biloba*) dan "ai-hao" (*Artemisia vulgaris*) yang saat ini terkenal sebagai neuritis dan antimalaria (Lucas, 1998).

Menurut Farnworth (1988) terdapat lebih kurang 119 bahan aktif biologi yang saat ini dipasarkan sebagai bahan obat penting dan telah digunakan oleh satu negara atau lebih adalah berasal dari 90 jenis tumbuhan dan 77 % berasal dari tumbuhan obat tradisional.

KEMOTAKSONOMI

Selain pendekatan etnobotani yang telah disebutkan diatas, maka pendekatan secara kimia tumbuhan (kemotaksonomi) berdasarkan kekerabatan (taksa) juga sangat berperan dalam menentukan keberhasilan identifikasi bahan aktif biologi yang terdapat pada tumbuhan atau jasad renik. Hal ini dengan asumsi bahwa secara empirik setiap organisme yang sekerabat mempunyai kandungan bahan kimia yang sama atau paling tidak mempunyai rangka (inti) karbon yang hampir sama. Semakin dekat deret kekerabatannya semakin dekat pula kesamaan kandungan kimia yang terdapat di dalamnya. Sebagai contoh beberapa jenis tumbuhan dari familia Solanaceae, *Hyoscyamus nigra*, *Atropa belladonae* dan *Datura stramonii*, ketiganya mengandung alkaloida golongan tropan yaitu, hiosiamina dan skopolamina. Alkaloida hiosiamina lebih banyak terdapat pada *H. nigra* dan *A. Belladonae*

dibandingkan *D. Stramonii*, begitu sebaliknya alkaloida skopolamina lebih banyak terdapat pada *D. Stramonii* dibandingkan dua tumbuhan lainnya. *Rauvolfia serpentina*, *Catharanthus roseus* dan *Alstonia scholaris* dari familia Apocynaceae dan sebagai bahan aktif biologinya adalah alkaloida golongan indol, yaitu reserpina, vinkristina, vinblastina dan alstonina. Hampir semua jenis familia Lauraceae dari suku Cinnamomum mengandung minyak atsiri dengan komponen pengidentifikasinya sinamaldehida dan kadar sinamaldehida tertinggi terdapat pada *Cinnamomum casia* dibandingkan *C. burmanii* dan *C. zeylanicum* (Tyler, 1988).

ORGANOLEPTIK

Indera perasa dan penciuman yang kita miliki dapat juga digunakan untuk identifikasi awal bahan aktif biologi secara sederhana dan bisa dilakukan dilapangan. Metoda ini tidak memerlukan peralatan khusus sama sekali. Dalam hal ini yang diperlukan hanyalah indera kita sendiri dan keberanian untuk mencobanya.

Bentuk

Identifikasi suatu tumbuhan yang mengandung bahan biokatif dapat dilihat dari bentuk atau keadaan tumbuhan itu sendiri, apakah tumbuhan tersebut mudah diserang hama penyakit atau predator. Hama penyakit dan predator tidak akan menyerang atau memakan tumbuhan yang mengandung bahan aktif biologi yang mematakannya, karena secara alami hama dan predator tersebut mempunyai insting alami untuk menghindari hal-hal yang membahayakan dirinya. Sebagai contoh adalah, *Nerium oleander* dan *Eucalyptus* spp., merupakan tumbuhan yang jarang diserang hama penyakit atau predator, karena tumbuhan tersebut mengandung bahan biokatif glikosida jantung (*N. oleander*) dan minyak atsiri (*Eucalyptus* spp.) (Tyler, 1988).

Rasa

Indera perasa merupakan sesuatu yang sangat sensitif dan kepekaannya dapat digunakan untuk identifikasi bahan aktif biologi yang terdapat pada tumbuhan. Setiap bahan aktif biologi mempunyai rasa yang khas atau spesifik, misalnya;

- 1). Rasa pahit merupakan ciri khas daripada bahan-bahan aktif biologi dari kelompok atau golongan alkaloida dan zat pahit (di- dan triterpenoida).
- 2). Rasa menggigit (iritasi) atau pedas dapat diidentifikasi bahwa bahan biokatifnya merupakan golongan fenolik dan turunannya.
- 3). Rasa manis menunjukkan bahwa senyawa aktif biologinya adalah golongan karbohidrat, terpenoida atau fenilpropanoida, flavonoida, di- dan triterpenoid glikosida.
- 4). Rasa sepat pada umumnya merupakan senyawa golongan tannin atau senyawa polifenol.
- 5). Rasa asam termasuk dalam kelompok atau golongan ini adalah asam karboksilat rendah.

Bau atau aroma

Seperti halnya rasa, maka identifikasi bahan aktif biologi melalui indera penciuman dapat dilakukan melalui bau atau aroma yang ditimbulkan oleh bahan tersebut, terutama yang mengandung bahan aktif biologi volatil atau minyak atsiri (minyak terbang) dan rosin. Bahan aktif biologi ini banyak dijumpai pada familia Berberidaceae, Capressaceae, Ericaceae, Esteraceae, Fabaceae, Fagaceae, Hamamelidaceae, Labiatae, Lauraceae, Magnoliaceae, Moraceae, Myrtaceae, Pinaceae, Poaceae, Rosaceae, Rutaceae dan Lamiaceae. Bahan-bahan aktif biologi yang dapat menimbulkan aroma tersebut pada umumnya adalah senyawa-senyawa golongan alkohol, keton dan aldehida dari mono- dan seskuiterpenoida serta fenilpropanoida (Tyler, 1988).

KIMIAWI

Identifikasi awal bahan aktif biologi secara kimiawi dapat juga dilakukan secara langsung di lapangan. Metoda identifikasi dapat dilakukan berdasarkan pada metoda penapisan fitokimia (*Phytochemical screening*) terhadap golongan senyawa kimia tertentu seperti, alkaloida, saponin, steroida, glikosida, flavonoida, antrakuinon, kumarin, tannin dan polifenol dengan menggunakan kit pereaksi warna (kualitatif). Sejumlah bahan-bahan kimia tertentu yang diperlukan telah dipersiapkan sebelum berangkat ke lapangan (Lampiran 1 dan 2)(Guevara & Recio, 1985).

Alkaloida

Alkaloida adalah senyawa nitrogen (N) yang merupakan hasil metabolit sekunder pada tumbuh-tumbuhan. Umumnya alkaloida menunjukkan efek fisiologik yang dramatik, sehingga banyak digunakan sebagai obat-obatan. Senyawa ini banyak menarik perhatian dalam mempelajari kimia bahan alam dan sejumlah tumbuhan telah diteliti. Hampir semua senyawa alkaloida mempunyai rasa pahit, "uji rasa" tidaklah cukup untuk mendeteksi keberadaan alkaloida dalam daun segar dan buah-buahan. Selain alkaloida maka zat pahit (bitter principles) juga mempunyai rasa yang sama. Alkaloida biasanya terdapat pada tumbuh-tumbuhan dalam bentuk garam yang larut dalam air sehingga dapat diekstraksi dengan pelarut alkohol yang diasamkan dengan 1 M asam klorida atau 10 % asam asetat.

Dalam pengujian alkaloida dengan menggunakan reaksi pengendapan pereaksi logam berat seperti, Mayer's, dapat terjadi kesalahan interpretasi, karena pereaksi Mayer's dengan protein akan memberikan reaksi yang positif. Untuk mengatasinya dapat dilakukan penambahan ekstrak dengan garam dapur (NaCl) sebelum penambahan pereaksi. Sejumlah senyawa-senyawa non-alkaloida juga memberikan reaksi terhadap pereaksi uji terutama senyawa-senyawa basa kuarterner dan amin oksida, untuk itu perlu dilakukan suatu seri prosedur ekstraksi dari material yaitu, asam-basa-pelarut organik-air. Sangat penting dilakukan uji alkaloida pada ekstrak asam dan pelarut organik, sedangkan pada ekstrak air akan terlarut senyawa-senyawa basa kuarterner dan amin oksida.

Untuk menentukan keberadaan alkaloida pada suatu material tumbuhan telah didesain suatu metoda yang dapat dilakukan dilapangan yaitu, metoda Culvernor-Fitzgerald. Uji ini sederhana dan cepat. Dengan uji lapangan ini pengumpulan material tumbuhan dapat dibatasi terhadap tumbuhan yang positif-alkaloida saja.

Metoda Culvernor-Fitzgerald.

Gerus 2 – 4 g material tumbuhan yang telah bersih potong-potong masukan kedalam mortar dan tambahkan kloroform secukupnya dan pasir bersih, kemudian digerus. Tambahkan 10 ml kloroform amoniakal diaduk rata. Campuran disaring kedalam

tabung reaksi dengan cara memerasnya pakai kain kasa untuk memindahkan ekstrak. Kemudian tambahkan 0.5 ml 1 M asam sulfat dan kocok baik-baik, biarkan beberapa saat. Pipet lapisan atas yang jernih kedalam 2 tabung reaksi kecil. Salah satunya diberikan pereaksi Dragendorff's dan tabung lainnya pereaksi Mayer's (2-3 tetes). Reaksi positif apabila menunjukkan endapan kuning jingga (orange) dengan pereaksi Dragendorff's dan endapan putih dengan pereaksi Mayer's. Catatan hasil sebagai berikut:

- (+) sedikit keruh
- (++) sangat keruh
- (+++) terjadi endapan

Saponin

Tumbuh-tumbuhan yang mengandung saponin telah lama digunakan oleh karena sifat deterjennya. Saponin adalah glikosida yang dicirikan oleh kemampuannya untuk menghasilkan busa atau buih bila dikocok dalam air, menyebabkan haemolisis kuat pada sel darah merah, menurunkan tegangan permukaan dan sebagai racun ikan.

Berdasarkan struktur aglikon (gugus non-gula), saponin dapat diklasifikasikan atas 2 tipe yaitu, steroida dan triterpen. Keduanya mempunyai ikatan glikosidat pada atom C-3. Karena struktur inilah, saponin dapat memberikan reaksi warna dengan pereaksi Liebermann-Burchard untuk uji unsaturasi sterol dan triterpen. Warna yang terbentuk mulai dari biru ke hijau, merah, pink sampai dengan merah jingga.

Tipe steroid saponin dijumpai pada banyak famili pada monokotiledon, sedangkan tipe triterpen saponin terdapat pada banyak famili daripada dikotiledon. Kelompok senyawa dari saponin ini yang penting dan mempunyai efek fisiologis adalah, hormon sex, kortison, vitamin D dan glikosida jantung.

Untuk menentukan keberadaan saponin pada suatu material tumbuhan telah didesain suatu metoda yang dapat dilakukan dilapangan yaitu, Uji busa / buih.

Uji busa/buih (The froth test)

Disiapkan "lerak" sebagai kontrol. Ekstrak lebih kurang 1 g buah *Sapindus rarak* atau dikenal sebagai "lerak" dengan 10 ml etanol. Masukan 2 ml ekstrak lerak kedalam tabung reaksi yang mempunyai ukuran sebagai kontrol.

Buat 10 ml ekstrak etanol 80 % dari material tumbuhan (lebih kurang 2 g) dan masukkan kedalam tabung reaksi yang mempunyai ukuran. Masing-masing tabung tambahkan 10 ml air, tutup dan kocok kuat-kuat selama 30 detik dan biarkan selama 30 min. Apabila busa/ buih yang terjadi lebih besar 3 cm dari permukaan larutan setelah 30 min, berarti material tumbuhan mengandung positif saponin. Untuk material tumbuhan yang menghasilkan sedikit busa/buih, tambahkan sedikit larutan Na_2CO_3 . Kondisi busa/buih tetap stabil dan keras menunjukkan adanya asam-asam lemak bebas.

Pereaksi Liebermann-Burchard

Ekstrak lebih kurang 10 g material tumbuhan dengan etanol 80 %, saring dan keringkan diatas penangas air. Kemudian lemaknya dihilangkan dengan pencucian heksana beberapa kali sehingga warna pigmen hilang atau larutan heksana tidak berwarna lagi.. Tambahkan residu dengan 10 ml kloroform dan aduk campuran selama 5 menit. Biarkan beberapa saat dan pipet kloroform ekstrak kedalam tabung reaksi lainnya melalui kertas saring yang berisikan natrium sulfat anhidrat. Dan bagi dua ekstrak kloroform yang diperoleh kedalam tabung reaksi.

Salah satu tabung reaksi tambahkan 3 tetes asam asetat anhidrat, kemudian tambahkan pelan-pelan asam sulfat pekat. Amati setiap perubahan warna yang terjadi, biarkan selama 1 jam, amati perubahan warnanya. Bandingkan dengan tabung reaksi lainnya sebagai kontrol.

Glikosida

Glikosida merupakan senyawa alam yang terdapat pada berbagai jenis tumbuh-tumbuhan tinggi dan memberikan pengaruh fisiologis. Senyawa ini terbentuk dari gugus non-gula (aglikon) dan gugus gula (glikon). Gugus aglikonnya sangat bervariasi tergantung dari jenis tumbuhan penghasil antara lain, alkaloida, flavonoida, steroida, triterpenoida dan lain sebagainya.

Untuk pemeriksaan atau uji glikosida dapat dilakukan selain berdasarkan aglikonnya, juga dapat dilakukan terhadap gugus gulanya (2-deoksi-gula). Karena gugus aglikon yang sangat bervariasi, maka uji lapangan untuk glikosida dilakukan terhadap gugus gulanya dengan pereaksi Keller-Kiliani.

Pereaksi Keller-Kiliani

Ekstrak lebih kurang 10 g material tumbuhan dengan etanol 80%, saring dan keringkan diatas penangas air. Kemudian lemaknya dihilangkan dengan pencucian heksana beberapa kali sehingga warna pigmen hilang atau larutan heksana tidak berwarna lagi.

Panaskan residu yang bebas lemak diatas penangas air untuk memindah sisa heksana. Tambahkan 3 ml pereaksi FeCl_3 kemudian diaduk dan pindahkan campuran kedalam tabung reaksi, teteskan 1 ml larutan asam sulfat pekat melalui dinding tabung reaksi (hati-hati asam sulfat bersifat korosif).

Biarkan campuran beberapa lama sehingga terbentuk warna dari merah kecoklatan, yang mungkin berubah menjadi biru atau lembayung. Perubahan tersebut menunjukkan reaksi positif terhadap 2-deoksi-gula.

Flavonoida

Flavonoida dilaporkan menunjukkan berbagai aktivitas biologi. Laporan terakhir memperlihatkan bahwa flavonoida mempunyai aktivitas sebagai antiviral, anti-fungal, anti-imflamasi dan sitotoksik. Flavonoida merupakan zat warna fenolik tumbuh-tumbuhan berdasarkan pada rangka karbon $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$ dan umumnya mengandung inti karbon γ -benzopiron seperti, flavon, isoflavon, flavonol dan flavanon. Pada senyawa flavonoida gugus hidroksil (OH) hampir selalu dijumpai pada posisi C5 dan C7 pada cincin A, disamping itu pada cincin B biasanya terdapat gugus hidroksi (OH) dan gugus alkilhidroksi (OR) pada posisi C4' atau pada posisi C3' dan C4'. Glikosida flavonoida mungkin terbentuk dengan adanya gugus gula pada setiap gugus -OH.

Flavonoida lainnya adalah antosianin dan leukoantosianin. Antosianin memainkan peran yang penting dalam pembentukan zat warna pada tumbuh-tumbuhan. Antosianin adalah glikosida dan bila dihidrolisa menghasilkan gula dan aglikon yang berwarna yang dikenal sebagai antosianidin. Leukoantosianin mempunyai gugus aglikon leukoantosianidin. Suatu senyawa tidak berwarna, tetapi memberikan warna merah intensif atau violet bila dipanaskan dengan suatu asam. Selain antosianin dan leukoantosianin flavonoida $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$ lainnya adalah, katekin, auron dan kalkon.

Salah satu cara untuk mengetahui keberadaan flavonoida pada material tumbuhan adalah pereaksi Wilstatter yang berdasarkan adanya inti karbon γ -benzopiron dengan logam Mg dan asam klorida pekat akan terjadi perubahan warna. Pereaksi Bate-Smith dan Metcalf berdasarkan terjadinya perubahan zat warna antosianin dan leukoantosianin dengan penambahan suatu asam akan memberikan warna merah, violet, biru dsb.

Pembuatan ekstrak

Ekstrak lebih kurang 10 g material tumbuhan dengan etanol 80 %, saring dan keringkan diatas penangas air. Kemudian lemaknya dihilangkan dengan pencucian heksana beberapa kali sehingga warna pigmen hilang atau larutan heksana tidak berwarna lagi. Panaskan residu yang bebas lemak diatas penangas air untuk memindah sisa heksana. Tambahkan residu dengan 20 ml etanol dan pindahkan masing-masing 10 ml kedalam 2 tabung reaksi. Masing-masing tabung reaksi ditambahkan 0.5 ml asam klorida pekat dan dilakukan uji dengan pereaksi Wilstatter dan Pereaksi Bate-Smith dan Metcalf.

Pereaksi Wilstatter

Salah satu tabung reaksi yang telah berisikan asam klorida pekat ditambahkan 3-4 butir logam magnesium (Mg). Amati perubahan warna yang terjadi dalam 10 menit. Apabila terbentuk warna, diencerkan dengan air secukupnya dan tambahkan 1 ml oktil alkohol. Kocok kuat-kuat dan biarkan dan amati perubahan warna pada masing-masing lapisan pelarut. Apabila terjadi pembentukan atau perubahan warna menunjukkan reaksi positif terhadap flavonoida dan sianidin.

Pereaksi Bate-Smith dan Metcalf

Tabung reaksi yang lainnya, setelah penambahan asam klorida pekat amati perubahan warnanya. Kemudian panaskan diatas penangas air selama 15 menit dan amati perubahan warna dalam waktu 1 jam. Apabila terjadi perubahan warna merah intensif atau violet menunjukkan adanya leukoantosianin.

Tannin dan polifenol

Istilah "*tannin*" pertama kalinya digunakan untuk bahan dari tumbuhan yang mempunyai

kemampuan untuk menggumpalkan protein hewan pada proses penyamakan kulit. Saat ini tannin mempunyai nilai penting sebagai sitotoksik, antikanker dan antitumor.

Tannin terdiri dari 2 kelompok berdasarkan hasil hidrolisanya. Tipe pertama dikenal sebagai pirogalol tannin yaitu, senyawa-senyawa fenolik yang mempunyai ikatan ester dengan gula. Tipe kedua adalah kondensasi tannin yang kadang-kadang disebut katekol tannin dan merupakan polimer dari senyawa-senyawa fenolik berhubungan dengan pigmen flavonoida. Penambahan suatu asam, kondensasi tannin akan mengalami dekomposisi menjadi senyawa-senyawa berwarna merah yang tidak larut disebut dengan phlobaphene atau merah tannin.

Tannin pada ekstrak tumbuh-tumbuhan diidentifikasi dengan uji gelatin yang dikembangkan oleh Wall *et al.* (1956) dengan prinsip pengendap protein dari gelatin oleh tannin (Fransworth, 1996). Dan hasil positif juga diberikan oleh pereaksi ferri klorida ($FeCl_3$), dimana tannin terhidrolisa memberikan warna biru atau biru-hitam, sedangkan kondensasi tannin memberikan warna biru-hijau. Senyawa-senyawa polifenol juga memberikan reaksi warna spesifik dengan $FeCl_3$, tetapi tidak memberikan endapan dengan gelatin.

Pembuatan ekstrak

Ekstrak lebih kurang 10 g material tumbuhan dengan etanol 80 %, saring dan keringkan diatas penangas air. Residu ekstrak larutkan dengan 20 ml air panas, tambahkan ekstrak 5 tetes larutan NaCl. Bagi ekstrak kedalam 3 tabung reaksi, satu tabung digunakan sebagai kontrol dan dua lainnya untuk uji gelatin dan ferri klorida ($FeCl_3$).

Uji gelatin

Salah satu tabung reaksi ditambahkan 3 tetes larutan gelatin dan amati endapan protein yang terjadi dan bandingkan dengan kontrol.

Pereaksi ferri klorida ($FeCl_3$)

Tabung reaksi lainnya ditambahkan 3 tetes pereaksi ferri klorida ($FeCl_3$), dimana tannin terhidrolisa memberikan warna biru atau biru-hitam, sedangkan kondensasi tannin memberikan warna biru-hijau dan bandingkan dengan kontrol.

Antrakuinon

Antrakuinon merupakan kelompok besar zat warna atau pigmen dari kuinon alami. Kelompok senyawa ini terdapat pada tumbuh-tumbuhan dalam bentuk sebagai turunan hidroksilasi, metilasi dan karboksilasi dari antrakuinon, antron, antranal atau diantron. Sebagai contoh umum dari antrakuinon antara lain, emodin, chrysophanol, physicon, aloe-emodin, rhein dan asam emodin. Antrakuinon mungkin dijumpai baik dalam bentuk glikosida dengan ikatan O- atau C-glikosida maupun aglikonnya. Biasanya digunakan sebagai zat warna dan katartiks (purgatives).

Turunan antrakuinon biasanya merupakan senyawa berwarna merah jingga yang larut dalam air panas dan alkohol encer. Identifikasinya dilakukan dengan cara uji Bortrager's; tetapi kadang-kadang uji ini memberikan hasil negatif pada antrakuinon yang sangat stabil atau turunan antranol, untuk itu identifikasi dilakukan modifikasi uji Bortrager's.

Antrakuinon memberikan warna yang spesifik dengan basa (LOH) seperti, merah, violet dan hijau. Secara spektrofotometri antrakuinon memberikan pita resapan yang berbeda dengan senyawa kuinon lainnya, dimana memberikan 4 atau 5 pita resapannya pada daerah UV dan sinar tampak. Paling tidak 3 dari pita resapan berkisar antara 215 dan 300 nm, dan lainnya diatas 430 nm.

Pembuatan ekstrak

Ekstrak lebih kurang 1 g material tumbuhan dengan etanol 80 %, saring dan keringkan diatas penangas air. Kemudian diekstrak dua kali dengan 5 ml benzena dan bagi ekstrak benzen menjadi 2 bagian tabung reaksi, satu tabung digunakan sebagai kontrol.

Kedalam tabung reaksi lainnya ditambahkan larutan amonia dan kocok. Apabila terjadi warna merah pada lapisan larutan amonia menunjukkan positif adanya senyawa antrakuinon. Hasil dibandingkan dengan kontrol.

Modifikasi Bortrager's

Ekstrak lebih kurang 1 g material tumbuhan dengan etanol 80%, saring dan keringkan diatas penangas air. Residu ekstrak tambahkan dengan 10 ml KOH 0.5 M dan 1 ml larutan hidrogen peroksida

5% panaskan selama 10 menit, saring dan asamkan dengan asam asetat glasial. Kemudian diekstrak dua kali dengan 5 ml benzena dan bagi ekstrak benzen menjadi 2 bagian tabung reaksi, satu tabung digunakan sebagai kontrol.

Kedalam tabung reaksi lainnya ditambahkan larutan amonia dan kocok. Apabila terjadi warna merah muda (pink) pada lapisan larutan amonia menunjukkan positif adanya senyawa antrakuinon. Hasil dibandingkan dengan kontrol.

AKTIVITAS BIOLOGI (Bioassay)

Untuk memperoleh material tumbuhan yang mengandung bahan aktif biologi yang terseleksi dari lapangan selain pendekatan-pendekatan yang telah disebutkan diatas juga dapat dilakukan uji aktivitas biologi secara sederhana di lapangan sesuai dengan kondisi yang ada dilapangan yaitu dengan menggunakan insekta seperti semut (uji insektisida dan repelan) dan uji keracunan terhadap ikan (fish poison test).

Pembuatan ekstrak

Ekstrak lebih kurang 20 g material tumbuhan dengan etanol 80%, saring dan keringkan diatas penangas air. Larutkan ekstrak dengan sedikit etanol, bagi dua ekstrak kedalam gelas beker 100 ml. Satu bagian digunakan untuk uji insektisida dan lainnya untuk uji keracunan pada ikan.

Uji insektisida

Ekstrak yang terdapat dalam gelas beker dicampur dengan sedikit susu kental manis atau gula. Kemudian serap dengan kapas sampai terserap semuanya dan keringkan. Setelah kering masukkan beberapa ekor semut yang sering dijumpai dilapangan. Amati selama 24 jam apakah semut tersebut menjauhi atau mati akibat memakan ekstrak yang telah dicampur dengan sedikit susu kental manis atau gula. Bandingkan dengan kontrol yang hanya berisikan kapas sedikit susu kental manis atau gula.

Uji keracunan terhadap ikan (fish poison test)

Kedalam gelas beker yang berisikan ekstrak tambahkan dengan 20 ml air panas. biarkan sampai etanolnya menguap. Setelah dingin masukan 10 ekor

ikan Guppy yang biasa terdapat pada anak sungai atau ikan kecil lainnya kedalam gelas beker dan amati selama 6 jam berapa jumlah ikan yang mati setiap satu jamnya. Bandingkan dengan kontrol gelas beker yang berisi ikan dan air saja.

KESIMPULAN

Kegiatan lapangan atau eksplorasi untuk mencari bahan-bahan yang mempunyai aktivitas biologi yang berasal dari tumbuh-tumbuhan merupakan suatu kegiatan yang selain cukup melelahkan, juga memerlukan pendanaan yang cukup besar dengan waktu relatif lebih singkat.. Untuk memperoleh hasil maksimal, alangkah baiknya sewaktu dilapangan telah dilakukan uji keberadaan bahan-bahan aktif biologi tersebut terhadap material tumbuhan yang diperoleh, sehingga material tumbuhan tersebut tidak merupakan sampah atau pada penelitian laboratorium selanjutnya tidak memberikan hasil sebagaimana diharapkan.

Pendekatan atau uji-uji sederhana yang telah diuraikan diatas sangat membantu peneliti untuk identifikasi awal dalam memilih material tumbuhan yang benar-benar potensial dan terseleksi, sewaktu melakukan kegiatan lapangan. Sehingga untuk penelitian laboratorium selanjutnya dapat memberikan hasil yang memuaskan.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous. 2000.** Complementary Medicine is Proving Popular With Consumers, *People Medical Society Newsletter* 19, 7.
- Chairul. 2000.** Socio-economic Research Purpose (SERP-LIPI) Bahan dan Proses Kimia Sub-Program; *Farmasi dan Kosmetika*, disampaikan pada lokakarya (Workshop) Penentu-an Prioritas Program Penelitian LIPI (SERP 11 – LIPI), di Bandung, tanggal 29 Mei 2000.

- Dash B. 1995.** *Ayurvedic Cures for Common Diseases* 5th Ed. Hind Pocked Book (P) Ltd. Delhi.
- Farnsworth NR, Fong HS and Soejarto DD. 1985.** Medicinal Plants in Therapy, *Bull. World Health Organiz.* 63, 965-961.
- Farnsworth NR and Soejarto DD. 1988.** Global Importance of Medicinal Plants, The Conservation of Medicinal Plants. *Proceeding of An International Consultation*, Chiang Mai, Thailand, 25-51.
- Farnsworth NR. 1990.** The Role of Ethnopharmacology in Drug Development, in bioactive compounds from plants. Chichester. *Ciba Foundation Symposium* 154 : 2.
- Farnsworth NR. 1996.** Biological and Phytochemical Screening of Plant, *Jour. Pharm. Sci.*, 55(3); 225-265.
- Guevera BQ and Recio BV. 1985.** *Phytochemical, Microbiological and Pharmacological Sreening of the Medicinal Plants*, Research Center University of Santo Thomas, Philippines.
- Janoff B. 1999.** Super Market Go Au Natural, *Progressive Grocer* 78, 75-80.
- Lucas R. 1998.** *Rahasia Herbalis Cina (Secrets of the Chinese Herbalist)*, Pustaka Delapratasa, Jakarta.
- Mills S and Bone K. 2000.** *Principles and Practice of Phytotherapy*, modern herbal medicine, Churchill Livingstone Publisher; 569-580.
- Rees Land Weil A. 2001.** Integrated medicine, *British Medical Journal*; London; Jan 20, 2001
- Sunoo BP. 1999.** Alternative medicine: The Arrival of New age Health Care, *Workforce*; Costa Mesa; Jun 1999.
- Tyler VC, Brady LR and Robbers JE. 1988.** *Pharmacognosy* Ed. 9th, Lea & Febiger, Philadelphia, USA.

Lampiran 1.

1). Perlengkapan yang diperlukan ;

1. 24 buah tabung reaksi 130 x 13 cm
2. 24 buah tabung reaksi 25 x 7 cm
3. 4 buah tabung reaksi berskala
4. 1 kotak kertas saring (11 cm)
5. 2 buah corong pisah diameter 5 cm
6. 4 buah gelas beker atau botol bermulut lebar (50 ml)
7. 2 buah lumpang dan alu (mortar & pestle)
8. 2 batang Spatel
9. 2 buah gunting
10. 2 gulung Kertas tisu

2). Bahan kimia yang diperlukan :

1. Pereaksi Drogendorff's
2. Pereaksi Mayer's
3. Etil alkohol (etanol)
4. Oktil alkohol (oktanol)
5. Benzena
6. *n*-Heksana
7. Kloroform amoniakel
8. Asam asetat anhidrat
9. 1 M Asam klorida
10. Asam sulfat pekat
11. Asam klorida pekat
12. Amonia (NH₃)
13. Asam asetat glacial
14. 0.5 M Kalium hidroksida (KOH)
15. Natrium karbonat (Na₂CO₃)
16. Ferri klorida (FeCl₃)
17. Natrium klorida (NaCl)
18. Logam Magnesium (Mg)

Catatan ;

Asam-asam kuat (asam sulfat dan asam klorida) dan pelarut-pelarut yang mudah terbakar (benzena, etanol, *n*- heksana dan kloroform) sebaiknya dibeli dan dipersiapkan di Ibukota Propinsi.

Lampiran 2.

Pembuatan pereaksi :

Drogendorff's

Larutan A. Larutkan 0.85 g bismuth (III) nitrat dalam campuran 10 ml asam asetat dan 40 ml air suling

Larutan B. Larutkan 8 g kalium iodida (KI) dalam 20 ml air suling.

Pembuatan larutan stok, campurkan larutan A dan B sama banyak dan untuk penyimpanan lama disimpan dalam botol pereaksi berwarna coklat.

Pembuatan larutan pereaksi, 1 ml larutan stok dicampur dengan 2 ml asam asetat dan 10 ml air suling.

Mayer's

Larutkan 1.4 g merkuri iodida dalam 60 ml air suling dan tambahkan larutan 5.0 g kalium iodida dalam 10 ml air suling, tambahkan air suling sampai 100 ml.

Larutan kloroform amoniakel

Kocok 1 liter kloroform dengan 3.6 ml ammonia pekat. Tambahkan Na_2SO_4 anhidrat untuk menarik air. Saring dan dekantir, masukan kedalam botol yang mempunyai tutup yang rapat. Untuk pemakaian lama simpan dalam kulkas. Larutan dapat bertahan beberapa minggu pada suhu kamar.

Larutan ferri klorida

Larutkan 1 g ferri klorida dalam 100 ml air suling.

Larutan gelatin

Masukan 1 % gelatin kedalam larutan 10 % natrium klorida.

Larutan asam klorida 1 M

Encerkan 8.5 ml asam klorida pekat (12N) kedalam air suling, tambahkan air suling sampai 100 ml.

Larutan kalium hidroksida 0.5 M

Larutkan 2.8 g KOH dengan air suling secukupnya, tambahkan air suling sampai 100 ml.

Larutan natrium karbonat 10%

Larutan 10 g Na_2CO_3 air suling secukupnya, tambahkan air suling sampai 100 ml.