

**UJI BIOLARVASIDA NYAMUK *Aedes aegypti* DARI HASIL ISOLASI EKSTRAK
METANOL TANAMAN SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* NESS)**

**Test of Biolarvasida *Aedes Aegypti* From Isolation Methanol Extract of Plant Sambiloto
(*Andrographis paniculata* NESS)**

*Elasti Imanta.*dan Nurul Hidajati*

Departement of Chemistry, Faculty Mathematics and Natural Sciences

State University of Surabaya

Jl. Ketintang, Surabaya, (60231), tlp 031-8298761

*Corresponding author, email: ima19.ei@gmail.com

Abstrak. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan struktur molekul senyawa hasil isolasi ekstrak metanol daun tanaman sambiloto (*Andrographis panuciolata*) serta menguji aktivitas biolarvasida isolat dari ekstrak metanol daun tanaman sambiloto (*Andrographis panuciolata*) terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti*. Penentuan struktur molekul dilakukan dengan menggunakan metode isolasi dan identifikasi. Metode isolasi didahului dengan proses ekstraksi serbuk kering daun tanaman sambiloto menggunakan pelarut metanol. Fraksinasi dan isolasi ekstrak metanol dilakukan menggunakan metode Kromatografi Kolom Gravitasi dan Kromatografi Lapis Tipis. Identifikasi isolat dilakukan secara fisika dan kimia. Uji secara fisika dilakukan dengan mengukur titik leleh isolate menggunakan Imelting Point Apparatus. Uji secara kimia dengan melakukan uji fitokimia isolat. Analisis isolat dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, IR dan GC-MS. Berdasarkan hasil identifikasi, isolat diduga senyawa golongan terpenoid dengan titik leleh sebesar 86-87°C. Hasil analisis spektrofotometer UV-Vis menghasilkan serapan panjang gelombang 215 nm dan 270 nm. Hasil Spektrofotometer IR menunjukkan gugus fungsi -OH (melebar), C-H (alkana), C-H (alkena), C=O, C-O dan -C=C- (alkena) serta didukung dengan hasil spektrofotometer massa yang menunjukkan bahwa isolat memiliki m/z 335 $[M]^+$. Berdasarkan hasil analisis senyawa hasil isolasi diduga merupakan senyawa 14-deoxyandrographolide. Uji aktivitas biolarvasida isolat terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* dilakukan menggunakan 6 konsentrasi dengan 3 kali pengulangan. Konsentrasi yang digunakan untuk isolat dan larvasida sintetik sebesar 0, 10, 20, 30, 40 dan 50 ppm. Berdasarkan uji biolarvasida, nilai LC50 ditentukan dengan menggunakan analisis probit. Hasil uji biolarvasida memberikan nilai LC50 untuk isolat dan larvasida sintetik "Abate" berturut-turut adalah 35,53 ppm dan 12,03 ppm.

Kata kunci : isolasi, identifikasi, biolarvasida, *Aedes aegypti*, *Andrographis paniculata* Ness

Abstrak. The aim of this research is to determine molecular structure of biolarvaside and to know the larvasidal bioactivity of isolat from leaves *Andrographis paniculata*. Determination of the molecular structure has been done by a series of isolation and identification methods. Isolation was carried out with extraction on dried leaves *Andrographis paniculata* by using methanol. The methanol extract was fracted by Gravitational Column Chromatography (GCC) and Thin Layer Chromatography (TLC). Identification of isolated compound was determined by physical test, chemical test. Physical test was determined by melting point using Melting Point Apparatus. Chemical test was determined by phytochemical. Analysis of isolate is done by spectroscopic UV-Vis, IR and GC-MS. The results of the analysis isolate, isolate is terpenoids with a melting point of 86-87°C. The results of the analysis of UV-Vis spectrophotometer produce absorption wavelength 216 nm and 271 nm, IR

spectrophotometer showed the results of functional groups OH (wide), C-H (alkana), C-H (alkena), C=O, C-O dan -C=C- (alkena) and supported result spectrophotometer mass if isolate has $m/335 [M]^+$. Based on identification of isolate, the isolate as 14-deoxyandrographolide. An other hand, methanol extract and isolate were also tested the larvacidal bioactivity. The larvacidal bioactivity test used six various of concentration and was triple replicates. Concentration for isolate and synthetic larvacide are 0, 10, 20, 30, 40 dan 50 ppm. Based on larvacidal bioactivity, LC_{50} value was determined by probit analysis. Larvacidal bioactivity test gave the LC_{50} for isolate and synthetic larvacide "Abate" are 35,53 ppm dan 12,03 ppm.

Keywords: *Andrographis paniculata*, Isolate, Biolarvacide, Terpenoids

PENDAHULUAN

Tumbuhan mengandung senyawa metabolit primer dan metabolit sekunder. Metabolit primer merupakan senyawa yang dihasilkan oleh makhluk hidup dan bersifat esensial bagi proses metabolisme sel tersebut. Metabolit sekunder merupakan suatu senyawa khas yang dimiliki oleh tumbuhan dan memiliki fungsi sebagai pemikat, penolak dan pelindung¹⁾. Beberapa penelitian mengenai tanaman yang mengandung senyawa metabolit sekunder seperti *Ageratum conyzoides* L., mengandung senyawa flavonoid, alkaloid dan minyak atsiri yang bersifat toksik bagi larva instar III *Aedes aegypti*²⁾. Biji tanaman karika (*carica pubescens*) mengandung senyawa terpenoid yang larut dalam pelarut n-heksana sebagai larvasida nyamuk. Senyawa flavonoid dan alkaloid dalam kulit batang *Saccopetalum horsfieldii* Benn bersifat toksik terhadap larva instar III *Culex fatigans*²⁾.

Tumbuhan lain yang juga diketahui banyak mengandung senyawa metabolit sekunder adalah sambiloto. Sambiloto merupakan salah satu tanaman yang berasal dari genus *Andrographis* yang telah lama dikenal sebagai bahan obat tradisional. Herba sambiloto merupakan salah satu bahan obat tradisional yang paling banyak dipakai di Indonesia. Tanaman sambiloto memiliki potensi yang sangat besar sebagai sumber hayati untuk keperluan *biopharmaceutical industry*. Tanaman sambiloto memiliki rasa yang sangat pahit karena mengandung senyawa *andrographolide*. *Andrographolide* merupakan salah satu senyawa yang mudah dijumpai dalam tanaman sambiloto. Senyawa *andrographolide* merupakan senyawa yang termasuk golongan trihidrosilat dengan rumus molekul $C_{20}H_{30}O_5$ ³⁾. Selain itu, sambiloto juga mengandung senyawa saponin, terpenoid, flavonoid dan tanin⁴⁾. Akar dan

batang tanaman sambiloto banyak ditemukan senyawa flavonoid. Bagian batang dan daun banyak mengandung diterpen lakton, alkana, ketone dan aldehid.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tanaman sambiloto, larva nyamuk *Aedes aegypti* instar III, metanol, *n*-heksana, kloroform, aquades, silica gel, larvasida sintetik, CH_3COOH , H_2SO_4 pekat, Etanol 70%, serbuk Mg, HCl pekat, NaCl 10%, gelatin 1%, $FeCl_3$ encer, amoniak encer, plat KLT.

Peralatan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi pisau, gelas kimia, gelas ukur, corong pisah, Spektrofotometer UV-Vis, IR, GC-MS, neraca analitik, pipa kapiler, bejana kromatografi, dan alat-alat yang biasa digunakan untuk praktikum.

Prosedur Kerja

Sampel Sambiloto berupa daun dibersihkan dan diangin-anginkan hingga kering, kemudian digiling hingga menjadi serbuk. Sebanyak 5000 g sampel diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol. Proses maserasi dilakukan selama 1x24 jam dan diulang sebanyak 3 kali. Selanjutnya sampel disaring dan diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50°C sampai menjadi ekstrak kental.

Ekstrak kental metanol selanjutnya dipartisi menggunakan pelarut *n*-heksana didalam corong pisah dan menghasilkan dua fraksi, yaitu fraksi metanol dan fraksi *n*-heksana. Pemurnian fraksi metanol dilakukan dengan menggunakan teknik kromatografi kolom gravitasi dan kromatografi lapis tipis. Pemisahan senyawa dilakukan dengan

menggunakan kromatografi kolom dan penggabungan fraksi menggunakan KLT. Fraksi-fraksi yang diperoleh diidentifikasi sifat fisika, sifat kimia dan diidentifikasi menggunakan spektrofotometri UV-Vis, spektrofotometri IR dan spektrofotometri GC-MS serta diuji aktivitas biolarvasidanya terhadap nyamuk *Aedes aegypti*.

Pengujian larvasida menggunakan larva nyamuk *Aedes aegypti* instar III. Sebanyak 10 ekor larva dimasukkan ke dalam sebuah wadah yang berisi isolat, larvasida sintetik dan kontrol.

Hasil isolasi sebanyak 100 mg dilarutkan dalam 1000 mL air. Larutan diambil dan dibuat konsentrasi 50, 40, 30, 20 dan 10 ppm. Masing-masing konsentrasi dan 10 ekor larva nyamuk *Aedes aegypti* dimasukkan ke dalam wadah. Pengamatan terhadap kematian larva dilakukan setelah 24 jam dan dimulai setelah memasukkan larva ke dalam wadah. Analisis data dilakukan untuk mencari konsentrasi kematian (LC_{50}).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi

Hasil ekstraksi 5000 g daun sambiloto dimaserasi menggunakan pelarut metanol didapatkan 372,1 g. Ekstrak metanol selanjutnya dipartisi menggunakan pelarut *n*-heksana, masing-masing diperoleh 202,5 g ekstrak kental metanol dan 28,8 g ekstrak kental *n*-heksana.

Pemisahan dan Pemurnian

Sebanyak 2 g ekstrak kental metanol dipisahkan menggunakan kromatografi kolom dengan fase diam 50 g silika gel dan fase gerak menggunakan campuran diclorometana : etil asetat (10:1). Eluat yang dihasilkan ditampung setiap 3 mL sampai menghasilkan 90 fraksi. Eluat dipantau dengan kromatografi lapis tipis. Berdasarkan pola hasil analisis KLT, penggabungan eluet dikelompokkan menjadi empat kelompok yaitu fraksi S1(10-22), fraksi S2(24-42), fraksi S3(68-78) dan fraksi S4(79-90).

Keempat kelompok fraksi tersebut yang paling memungkinkan dilanjutkan pada tahap berikutnya adalah fraksi S3. Fraksi S3 memiliki satu noda dengan R_f 0,71. Fraksi S3 diuji kemurniannya secara KLT dengan menggunakan beberapa campuran eluen yang

memiliki berbagai tingkat kepolaran yang berbeda-bada.

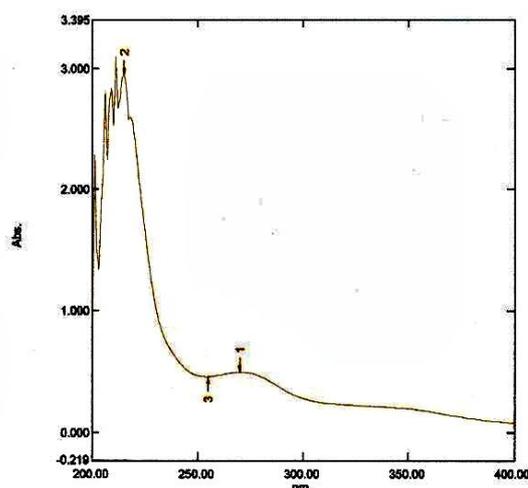
Uji kemurnian isolat secara KLT menggunakan beberapa campuran eluen diantaranya *n*-heksana : etil asetat (7:3), *n*-heksana : etil asetat : metanol (6:3:1), dan *n*-heksana : kloroform (9:1). Timbulnya satu noda pada berbagai campuran eluen menunjukkan bahwa fraksi S3 mengandung satu senyawa dan dapat dinyatakan bahwa fraksi S3 relatif murni secara KLT. Uji fitokimia menunjukkan bahwa fraksi S3 mengandung senyawa golongan terpenoid. Uji titik leleh terhadap isolat menunjukkan bahwa isolat memiliki titik leleh sebesar 86-87°C.

Data Spektrofotometri UV-Vis

Hasil pengukuran isolat menggunakan spektrofotometer UV-Vis ditunjukkan pada Gambar 1.

Berdasarkan pada Gambar 1, tampak bahwa isolat menunjukkan dua puncak serapan maksimum yaitu pada panjang gelombang 215 dan 270 nm.

Hasil spektrofotometri UV-Vis menunjukkan bahwa senyawa dalam isolat mengandung gugus kromofor terkonjugasi dan tak terkonjugasi. Adanya kromofor tak terkonjugasi menyebabkan transisi elektron $n \rightarrow \pi^*$ pada panjang gelombang 270. Adanya kromofor terkonjugasi menyebabkan transisi elektron $\pi \rightarrow \pi^*$ pada panjang gelombang 215nm⁵⁾.

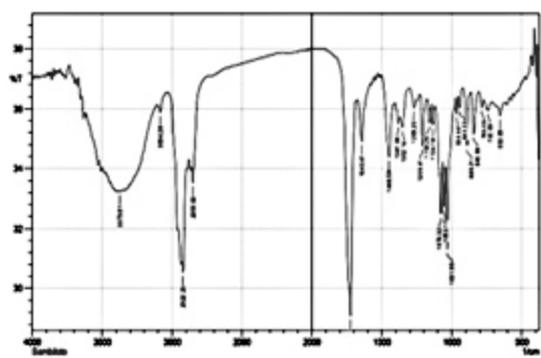


Gambar 1. Hasil Spektrofotometri UV-Vis Isolat S3

Data Spektrofotometri IR

Hasil pengukuran spektrofotometer IR dari isolat aktif menggunakan pelet KBr dapat dilihat pada Gambar 2.

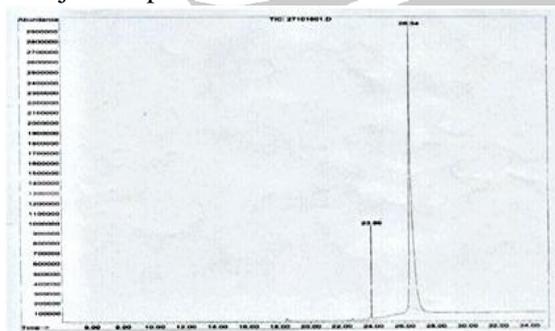
Hasil pengukuran menggunakan spektrofotometer IR menunjukkan adanya gugus C=O keton pada pita serapan yang tajam di daerah bilangan gelombang 1724 cm^{-1} . Gugus OH pada pita serapan melebar di bilangan gelombang 3373 cm^{-1} . Pita serapan yang medium pada daerah bilangan gelombang $1448\text{-}1643\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya gugus -C=C- aromatik. Adanya gugus C-O yang ditunjukkan pita serapan pada bilangan gelombang $1053\text{-}1209\text{ cm}^{-1}$ (6).



Gambar 2. Hasil Spektrofotometer IR isolat S3

Data Spektrofotometri GC-MS

Hasil pengukuran menggunakan spektrofotometer GC-MS terhadap isolat S3 ditunjukkan pada Gambar 3.

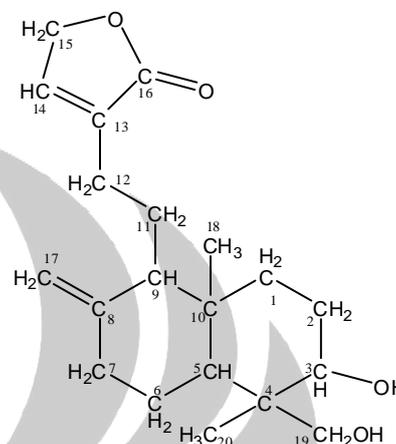


Gambar 3. Profil Kromatogram Isolat S3

Berdasarkan hasil kromatogram, tampak bahwa terdapat dua puncak yang muncul dengan waktu retensi 26,34 dan 23,86 menit. Dua puncak itu menunjukkan senyawa 14-deoxyandrographolide dan senyawa 1,2-benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester.

senyawa 1,2-benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester merupakan senyawa bawaan

dari silika, sehingga dapat dinyatakan bahwa senyawa tersebut merupakan senyawa pengotor. Senyawa 14-deoxy andrographolide diduga merupakan senyawa hasil isolasi dari ekstrak metanol tanaman sambiloto.



Gambar 4. Senyawa 14-deoxyandrographolide

Aktivitas Larvasida Ekstrak Metanol dan Isolat S3

Hasil pengujian aktivitas larvasida terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* instar III selama 24 jam setelah perlakuan dapat dilihat pada Tabel 1.

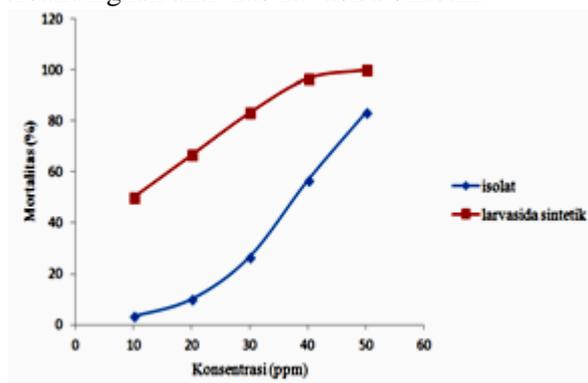
Tabel 1. Pengaruh Isolat dan Abate Terhadap Mortalitas Larva Nyamuk *Aedes aegypti*

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Mortalitas rata-rata (%)
isolat	0	0,00
	10	3,33
	20	10,00
	30	26,67
	40	56,67
Abate	0	0,00
	10	50,00
	20	66,67
	30	83,33
	40	96,67
	50	100,00

Berdasarkan Tabel 1, dapat diketahui bahwa persentase mortalitas dipengaruhi oleh konsentrasi, dimana semakin tinggi konsentrasi, persen mortalitas juga semakin tinggi. Pada konsentrasi 10 ppm mortalitas larva oleh isolat sebesar 3,33% namun

mortalitas akibat abate sebesar 50,00%. Pada konsentrasi 20 ppm mortalitas yang disebabkan isolat sebesar 10,00% dan mortalitas akibat abate sebesar 66,67%.

Pada konsentrasi 50 ppm, isolat menunjukkan mortalitas larva sebesar 83,3% sedangkan larvasida sintetik menunjukkan mortalitas sebesar 100%. Hal ini berarti isolat S3 menunjukkan aktivitas larvasida lebih kecil dibandingkan aktivitas larvasida sintetik.



Gambar 5. Grafik persentase mortalitas rata-rata larva nyamuk *Aedes aegypti*

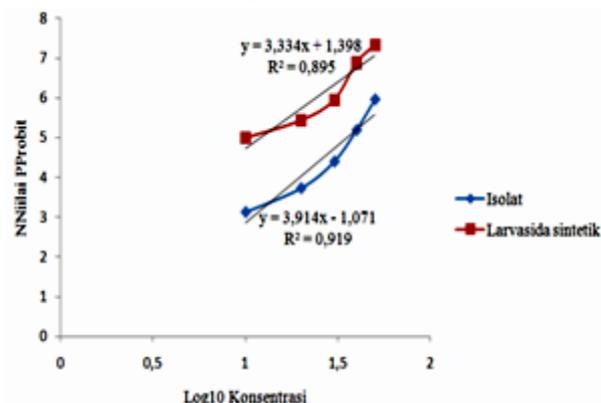
Penetapan nilai *lethal concentration (LC)50* diperoleh dengan menghitung kematian larva dalam berbagai konsentrasi menggunakan analisis probit. Penetapan nilai LC_{50} digunakan sebagai salah satu cara dalam melakukan pemeriksaan bahan alami sebagai larvasida⁷⁾.

Tabel 2. Hasil Analisis Probit Isolat dan Abate

Sampel	Log 10 Konsentrasi	Nilai Probit (%)
isolat	-	-
	1,00	3,12
	1,30	3,72
	1,48	4,39
	1,60	5,18
	1,70	5,95
Abate	-	-
	1,00	5,00
	1,30	5,44
	1,48	5,95
	1,60	6,88
	1,70	7,33

Nilai LC_{50} didapatkan dari persamaan garis linear yang dibentuk antara Log10 konsentrasi dan nilai probit pada grafik (Gambar 6). Nilai LC_{50} dari isolat sebesar 35,48 ppm dan LC_{50} larvasida sintetik sebesar 12,03 ppm. Nilai R yang diperoleh dari

persamaan garis adalah 0,959 dan 0,946 yang menunjukkan adanya korelasi yang sangat kuat antara mortalitas dan konsentrasi.



Gambar 6. Persamaan Garis Dari Isolat dan Larvasida Sintetik

Suatu zat dapat dikatakan bersifat toksik pada uji insektisida jika memiliki nilai $LC_{50} \leq 500$ ppm⁸⁾. Pada percobaan diperoleh nilai LC_{50} isolat sebesar 35,48 ppm dan 12,03 ppm untuk larvasida sintetik. Hal ini berarti senyawa yang terkandung dalam daun tanaman sambiloto bersifat sangat toksik terhadap serangga.

Persentase kematian rata-rata dibawah 5% pada perlakuan kontrol menunjukkan bahwa mortalitas larva uji disebabkan adanya senyawa metabolit sekunder dan bukan dikarenakan faktor pelarut.

Ekstrak metanol dan hasil isolasi daun tanaman sambiloto mengandung senyawa metabolit sekunder golongan terpenoid. Senyawa golongan terpenoid sangat berpotensi sebagai penghambat makan pada sejumlah serangga. Metabolisme larva akan menurun apabila larva memakan makanan yang mengandung senyawa bersifat toksik sehingga energi untuk pertumbuhan larva berkurang⁹⁾.

SIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Hasil identifikasi senyawa menunjukkan bahwa isolat S3 diduga merupakan senyawa golongan terpenoid dan turunan andropgraphoide yaitu senyawa 14-deoxyandropgrapholide.
2. Isolat S3 bersifat toksik terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Chumaidah, N.F. dan Ersam, T. 2006. *Isolasi Senyawa Kumarin dari Fraksi Polar pada Ekstrak Etil Asetat Garcinia balica (Mundu Alas)*. Surabaya: ITS
2. Moehammadi, N. 2005. *Potensi Biolarvasida Ekstrak Herba Agerantum conyzoides Linn dan daun Saccopetalum horsfieldii Benn terhadap Larva Nyamuk Aedes aegypty L.* jurnal Berkala Penel. Hayati 10-14
3. Kumaro, A.C., Hasan, M. 2007. *Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Andrographolide from Andrographis paniculata: Effect of the Solvent Flow Rate, Pressure, and Temperature.* *China Journal of Chemical Engineering*, Vol 15, 877-883
4. Adelyna. 1999. *Penelusuran Senyawa Bioaktif Sambiloto (Andrographis paniculata) dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)*. Bogor: IPB
5. Suyatno. 2011. *Penentuan Struktur Molekul Senyawa Organik*. Surabaya: Unesa University Press.
6. Creswell, J. Clifford, Runquist, A. Olaf dan Campbell, M. Malcolm. 1982. *Analisis Spektrum Senyawa Organik*. Bandung : ITB
7. WHO. 2005. *Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvaces.* <http://who.int/>
8. Lu, Frank C. 1995. *Basic Toxicology.* <http://icmns.fa.itb.ac.id/proceedings/SESSION-4-PHARMACEUTICAL-SCIENCES/564>.
9. Schoonhoven C.Y. 1996. *Pengaruh Ekstrak Biji Annona muciratal Terhadap Indeks Nutrisi, Kelulushidupan, Pertumbuhan dan Perkembangan Larva Hiliothis (Helicoverpa) armigera.* (Jurnal Online)