

Senyawa Bufadienolida yang bersifat Insektisida, Daigremontianin dari daun Cocor Bebek (*Kalanchoe daigremontiana*)

Tri Mayanti, Desi Harneti Putri Huspa, Nurlelasari, Agus Safari, dan Unang Supratman*

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Padjadjaran, Jalan Raya Bandung-Sumedang KM 21, Jatinangor, 45363
Sumedang 40600, e-mail: u_supratman@unpad.ac.id

Abstrak

Dalam penelitian berkelanjutan untuk pencarian senyawa-senyawa yang bersifat insektisida dari tanaman *Kalanchoe* (Cocor bebek) Indonesia, diperoleh hasil bahwa ekstrak metanol daun Cocor bebek (*Kalanchoe daigremontiana*) memberikan aktivitas insektisida yang kuat terhadap instar ke tiga larva ulat sutera (*Bombyx mori*). Ekstrak metanol yang diperoleh selanjutnya dipisahkan senyawa-senyawanya menggunakan partisi dengan pelarut organik dan kombinasi kolom kromatografi pada silika gel dan ODS sehingga dihasilkan satu senyawa aktif insektisida. Struktur kimia senyawa yang bersifat insektisida tersebut ditentukan dengan metoda spektroskopi dan perbandingan data spektra senyawa analog yang telah diperoleh dari penelitian sebelumnya sehingga senyawa aktif insektisida tersebut diidentifikasi sebagai senyawa turunan bufadienolida, daigremontianin. Daigremontianin menunjukkan aktivitas insektisidal yang kuat terhadap instar ke tiga ulat sutera (*Bombyx mori*) dengan LD₅₀ 0,9 µg/g diet.

Kata kunci: *Kalanchoe*; Crassulaceae; Bufadienolide; aktivitas insektisida, *Kalanchoe daigremontiana*

Abstract

In the course of our continuing search for novel insecticidal compound from Indonesian *Kalanchoe* plants, the methanolic extract of the leaves of Cocor bebek (*Kalanchoe daigremontiana*) showed strong insecticidal activity against the third instar larvae of silkworm (*Bombyx mori*). The methanol extract was separated their compound by organic solvent partition and column chromatography on Silica gel and ODS to yield an active compound. The chemical structure of an active compound was elucidated by spectroscopic method and comparison with those related data previous reported and identified as a bufadienolide derivate compound, daigremontianin. Daigremontianin showed strong insecticidal activity against the third instar larvae of silkworm as a LD₅₀ 0.9 µg/g diet.

Kata kunci: *Kalanchoe*; Crassulaceae; Bufadienolide; insecticidal activity, *Kalanchoe daigremontiana*

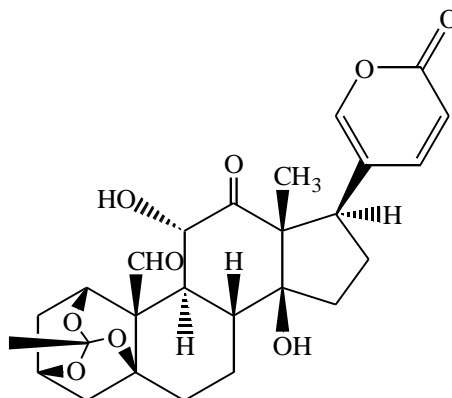
PENDAHULUAN

Selama lima dasawarsa terakhir, insektisida konvensional seperti hidrokarbon terklorinasi, organofosfat, karbamat, dan piretroid telah berhasil mengendalikan hama pertanian, tetapi, kebanyakan bahan kimia dari insektisida konvensional ini dapat merugikan kehidupan manusia dan organisme menguntungkan lainnya serta dapat mengganggu kehidupan ekosistem. Meskipun berbagai usaha telah dilakukan untuk meminimalisasi dampak negatif terhadap lingkungan, tetapi tuntutan terhadap keselamatan lingkungan dan penggunaan insektisida yang lebih selektif terhadap hama tertentu semakin meningkat.¹⁾ Pada saat ini kebutuhan akan pengendalian hama di bidang pertanian semakin meningkat, dan perhatian kembali diarahkan terhadap bahan alam karena dapat mengurangi dampak negatif terhadap lingkungan dan lebih spesifik terhadap jenis hama tertentu.²⁾

Senyawa bioaktif yang diperoleh dari bahan alam selain daya racunnya masih tetap tinggi, juga mudah mengalami biodegradasi yang tidak membahayakan lingkungan. Hal ini didasarkan pada struktur kimianya yang umumnya terdiri dari karbon, hidrogen, oksigen, dan nitrogen.³⁾ Ekstrak tumbuhan telah lama digunakan sebagai insektisida oleh manusia sebelum masa Romawi.⁴⁾ Beberapa insektisida penting yang telah digunakan secara luas di bidang Pertanian yang berasal dari tumbuhan adalah rotenon,⁵⁾ piretrin,⁶⁾ dan anabasin.⁷⁾ Perlu ditekankan bahwa kebanyakan tumbuhan yang memiliki aktivitas insektisida berasal dari tumbuhan tropis.

Dalam kegiatan penelitian berkelanjutan kami terhadap pencarian senyawa-senyawa insektisida baru dari tanaman *Kalanchoe* Indonesia, kami telah mengisolasi dan menjelaskan dua senyawa bufadienolida yang bersifat insektisida, dari daun *Kalanchoe pinnata*,⁸⁾ empat senyawa bufadienolida yang bersifat insektisida dari daun *Kalanchoe daigremontiana* x *tubiflo*.⁹⁾ Dalam penelitian lanjutan terhadap senyawa-senyawa insektisida dari tanaman *Kalanchoe* Indonesia (syn. *Bryophyllum*), kami menemukan bahwa ekstrak metanol daun *Kalanchoe daigremontiana* memberikan aktivitas insektisida yang kuat terhadap instar ke tiga ulat sutera (*Bombyx mori*).

Kalanchoe daigremontiana (Crassulaceae, dikenal sebagai tanaman “cocor bebek” di Indonesia adalah tanaman herba yang tumbuh sepanjang tahun dan mempunyai daun yang berair.¹⁰⁾ Tanaman ini di kenal di masyarakat Indonesia untuk penanggulangan berbagai penyakit diantaranya demam, batuk, dan berbagai penyakit kulit.¹¹⁾ Penelitian terhadap kandungan kimia tumbuhan *K. daigremontiana* dilaporkan mengandung sterol dan bufadienolida,¹²⁾ tetapi kandungan senyawa yang bersifat insektisida belum diketahui. Dalam makalah ini, kami akan melaporkan isolasi, penentuan struktur senyawa yang bersifat insektisida, dan aktivitas insektisidal senyawa daigremontianin yang diperoleh dari daun *Kalanchoe daigremontiana*.



Gambar 1. Struktur senyawa Daigremontianin

BAHAN DAN ALAT

Bahan tanaman

Daun tanaman cocor bebek (*Kalanchoe daigremontiana*) dikumpulkan dari kebun percobaan di daerah Bandung, Jawa Barat, Indonesia pada bulan September 2002 dan diidentifikasi di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA Universitas Padjadjaran, Indonesia. Contoh herbarium dari tanaman tersebut tersimpan di Herbarium Jurusan Biologi FMIPA, Unpad.

Bahan Kimia

Kolom kromatografi dilakukan pada Silika gel G60 Merck (70-230 Mesh) dan Inertsil ODS (Fuji silysia), analisis kromatografi lapis tipis pada plat Silika gel Merck GF₂₅₄ 0,2 mm, noda pada kromatografi lapis tipis divisualisasi di bawah sinar ultra violet pada λ 254 dan 367 nm atau dengan penampak noda 10% asam sulfat dalam etanol yang diikuti dengan pemanasan.

Peralatan

Titik leleh tidak terkoreksi; rotasi optik diukur dengan menggunakan Horiba model SEPA-300 polarimeter; Spektra UV dicatat pada Hitachi model U-3210 spectrophotometer; IR spectra pada Perkin-Elmer 1760X dengan KBr; Spektra massa dicatat pada JEOL JMS-DX300; Spektra; ¹H dan ¹³C-NMR diperoleh dengan menggunakan JEOL JNM A-500 spectrophotometer dengan TMS sebagai standard dalam.

Uji Hayati terhadap ulat sutera¹³⁾

Larva ulat sutera yang akan digunakan untuk uji hayati diletakkan pada makanan buatan yang dibeli dari Nippon Nosan Kogyo Co., Ltd. Terhadap 1 gram makanan buatan, 100 μ l ekstrak metanol atau jumlah tertentu dari sampel yang akan diuji di tambahkan pada cawan petri. Setelah pelarutnya diuapkan lima ekor larva ulat sutera

instar ke tiga diletakkan pada cawan petri tersebut, dan laju mortalita diamati setelah 24 jam pada suhu 25°C setelah perlakuan awal.

Ekstraksi dan isolasi

Daun segar *K. daigremontiana* diekstraksi secara tuntas dengan metanol pada suhu kamar. Ekstrak metanol yang diperoleh selanjutnya dipekatkan dan dipartisi antara diklorometan dan air sehingga dihasilkan ekstrak diklorometan aktif insektisida. Ekstrak diklorometan aktif selanjutnya dipartisi antara etil asetat dan air dihasilkan ekstrak aktif etil asetat. Ekstrak etil asetat yang diperoleh dikeringkan dengan natrium sulfat anhidrat, dan dipekatkan pada tekanan rendah sehingga dihasilkan residu berwarna coklat. Residu (12,8 g) dikromatografi pada Silika gel 60 (70-230 mesh) dengan eluen *n*-heksan dan peningkatan rasio etil asetat, dan etil asetat dengan peningkatan rasio metanol menghasilkan dua fraksi aktif, eluat 100% etil asetat dan 10% metanol dalam etil asetat.

Fraksi yang terelusi dengan 100% etil asetat selanjutnya dipisahkan berturut-turut dengan kolom kromatografi pada Silika gel 60 dengan sistem pelarut kloroform:metanol (49:1) dan *n*-heksan:aseton (7:3) serta pada ODS dengan sistem pelarut metanol:air (2:3) diikuti dengan kristalisasi dalam metanol sehingga dihasilkan suatu senyawa aktif insektisida (14,6 mg).

Senyawa aktif (Daigremontianin)

Daigremontianin, kristal prisma tak berwarna; titik leleh 269-271 °C; $[\alpha]_D^{20} + 12,6^\circ$ (*c* 0,095, MeOH); UV λ_{maks} (MeOH) nm (ϵ): 300 (6.100); IR ν_{maks} (KBr): 3445, 2882, 1709, dan 1122 cm^{-1} ; MALDI TOF-MS m/z 487 $[M+H]^+$; NMR 1H - dan ^{13}C -NMR (Tabel 1).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstrak metanol dari daun segar cocor bebek (*Kalanchoe daigremontiana*) dipekatkan dan dipartisi antara diklorometan dan air. Ekstrak diklorometan menunjukkan aktivitas insektisida terhadap ulat sutera. Ekstrak diklorometan selanjutnya dipartisi antara *n*-heksan dan metanol yang mengandung 10% air. Lapisan bawah yang aktif selanjutnya diekstraksi dengan etil asetat. Dengan menggunakan aktivitas insektisida untuk mengikuti pemisahan, ekstrak etil asetat dipisahkan dengan kombinasi kromatografi kolom pada Silika gel 60 dan ODS dihasilkan suatu senyawa aktif insektisidal.

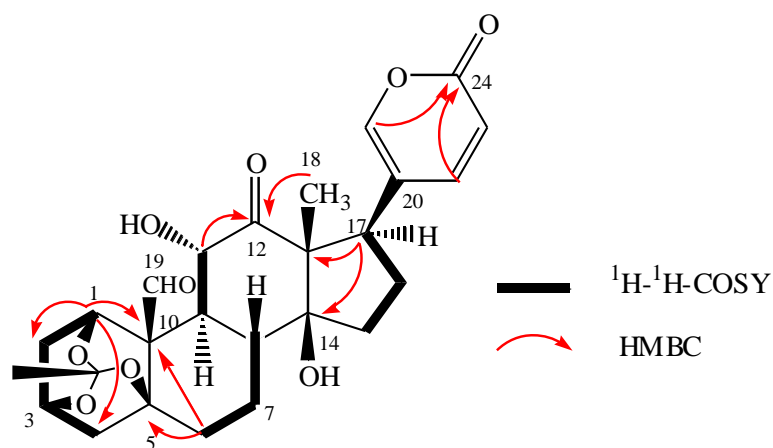
Senyawa aktif memberikan rumus formula $C_{26}H_{30}O_9$ berdasarkan data MALDI TOF-MS bersama dengan data spektra NMR 1H - dan ^{13}C (Tabel 1), menunjukkan bahwa senyawa aktif mempunyai dua belas ekuivalensi ikatan rangkap. Spektra NMR 1H - dan ^{13}C senyawa aktif sangat mirip dengan senyawa bryophyllin,^{8,9} kecuali hilangnya sinyal dari metilena pada δ_H 1,41 (1H, t, $J=12,5$ Hz), dan 1,67 (1H, m) (δ_C 51,1) seperti yang diamati untuk senyawa aktif, dan munculnya sinyal untuk gugus keton pada δ_C 211,7, diduga bahwa senyawa aktif adalah analog keto dari bryophyllin A.

Tabel 1. Data NMR Daigremontianin^a

Posisi karbon	¹³ C-NMR	¹ H-NMR
	δ_C (mult.)	δ_H (Integral, mult., J Hz)
1	73,2 (d)	5,10 (1H, d, 4,3)
2	27,6 (t)	1,92 (1H, dt, 1,5, 14,0) 2,31 (1H, ddd, 4,3, 6,1, 14,0)
3	67,2 (d)	4,36 (1H, d, 1,5)
4	33,3 (t)	2,04 (1H, m) 2,14 (1H, m)
5	74,6 (s)	
6	33,2 (t)	1,74 (1H, m) 2,02 (1H, m)
7	22,1 (t)	1,42 (1H, m) 2,17 (1H, m)
8	39,8 (d)	2,22 (1H, m)
9	45,1 (d)	1,58 (1H, dd, 1,5, 12,5)
10	52,4 (s)	
11	72,0 (d)	4,98 (1H, dd, 3,0, 12,5)
12	211,7 (s)	
13	61,9 (s)	
14	85,0 (s)	
15	32,0 (t)	1,42 (1H, m) 1,73 (1H, m)
16	27,7 (t)	2,09 (1H, m) 2,45 (1H, m)
17	40,4 (d)	4,07 (1H, dd, 6,7, 9,8)
18	16,9 (q)	0,92 (3H, s)
19	208,7 (d)	10,41 (1H, d, 2,1)
20	120,1 (s)	
21	150,2 (d)	7,38 (1H, dd, 0,9, 2,4)
22	146,2 (d)	7,65 (1H, dd, 2,4, 9,8)
23	115,9 (d)	6,29 (1H, dd, 0,9, 9,8)
24	161,9 (s)	
25	110,6 (s)	
26	25,6 (q)	1,46 (3H, s)

^adiukur dalam CDCl₃ pada 500 MHz untuk ¹H dan 125 MHz untuk ¹³C

Untuk menentukan posisi dari gugus keto pada senyawa aktif tersebut, percobaan HMBC (*Heteronuclear multiple bond connectivity*) dilakukan (Gambar 2). Signal dari Me-18 (δ_H 0,92) dan H-11 (δ_H 4,98) berkorelasi dengan C-12 (δ_C 211,7), menunjukkan bahwa senyawa aktif adalah 12-keto dari bryophyllin A. Hasil pengamatan ini bersama dengan kemiripan data spectra dan sifat-sifat fisikokimia yang diperoleh sebelumnya,¹²⁾ senyawa aktif diidentifikasi sebagai daigremontianin.



Gambar 2. Spektra ^1H - ^1H -COSY, dan HMBC terpilih dari daigremontianin

Aktivitas insektisida senyawa daigremontianin diuji terhadap instar ke tiga ulat sutera (*Bombyx mori*). Pada uji oral, senyawa daigremontianin menunjukkan aktivitas insektisida yang sangat kuat dengan LD_{50} 0,9 $\mu\text{g/g}$ diet.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Tomoyuki Fujita dan Dr. Kohki Akiyama, Laboratory of Natural Products Chemistry, Division of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agriculture and Life Sciences, Osaka Prefecture University, Osaka, Japan, atas bantuan pengukuran spektra NMR dan MS. Terima kasih juga tertuju pada Drs Joko Kusmoro, Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Padjadjaran, untuk pengumpulan dan identifikasi bahan tumbuhan.

PUSTAKA

1. Achmad, S.A., Effendi, Ghisalberti., Hakim, E.H., Juliawaty, L.D., Makmur, L., White. A.H, *Proceedings ITB*, 4(2/3), 9 (1991b).
2. Balandrin, M.F., Klocke, J.A., Wurtele, E.S., and Bollinger, Wm. H., Natural plant chemicals: source of industrial and medicinal materials. *Science*, 228, 1154-1160 (1985).
3. Fukami, H., and Nakajima, M., Rotenone and the rotenoids. In "Naturally Occurring Insecticides", eds. Jacobson, M., and Crosby, D.G., Dekker, New York, pp. 71-79 (1971).

4. Ishaaya, I., and Horowitz, A. R., Insecticides with novel modes of action, an overview. In "Insecticides with Novel Mode of Action, Mechanism and Application", eds. Ishaaya, I., and Degheele, D., Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-25 (1998).
5. Matsui, M., and Yamamoto, I., pyrethroids. In "Naturally Occurring Insecticides", eds. Jacobson, M., and Crosby, D. G., Dekker, New York, pp. 3-70 (1971).
6. Schmeltz, I., Nicotine and other tobacco alkaloids. In "Naturally Occurring Insecticides", eds. Jacobson, M., and Crosby, D. G., Dekker, New York, pp. 99-136 (1971).
7. Secoy, D. M., and Smith, A. E., Use of plants in control of agricultural and domestic pests. *Econ. Bot.*, **37**, 28-57 (1983).
8. Supratman, U., Fujita, T., Akiyama, K., and Hayashi, H., 2000. New insecticidal bufadienolide, bryophyllin C, from *Kalanchoe pinnata*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 1309-1311.
9. Supratman, U., Fujita, T., Akiyama, K., and Hayashi, H., 2001. Insecticidal compounds from *Kalanchoe daigremontiana*. *Phytochemistry*, **58**, 311-314.
10. Heyne, K., "Tumbuhan Berguna Indonesia" 1987, Badan Penelitian dan Pengembangan, Departemen Kehutanan, Indonesia, Jakarta, halaman, 845-846.
11. Sjamsu Hidayat, S. S dan Hutapea, J. R., 1991, "Tanaman Obat Indonesia" Badan Penelitian dan Pengembangan, Departemen Kesehatan, Indonesia, Jakarta, halaman. 220-221.
12. Wagner, H., Fischer, M., and Lotter, H., 1985, Isolation and structure determination of daigremontianin, a novel bufadienolida dari *Kalanchoe daigremontiana*, *Planta Med.*, 169-170.
13. Hayashi, H., Takiuchi, K., Murao, S., Arai, M., 1989. Structure and insecticidal activity of new indole alkaloids, okaramines A and B, from *Penicillium simplicissimum* AK-40. *Agri. Biol. Chem.*, **53**, 461-469.