

## THE PORIFERASTA COMPOUND-5,22E,25-TRIEIN-3-O $\beta$ FROM *Clerodendrum paniculatum* LEAF AS INDUCER AGENT OF SYSTEMIC RESISTANCE ON RED CHILLI PLANT *Capsicum annuum* L FROM CUCUMBER MOSAIC VIRUS (CMV)

**Senyawa Poriferasta-5,22E,25-trien-3 $\beta$ -ol dari Daun *Clerodendrum paniculatum* sebagai Agen Penginduksi Ketahanan Sistemik pada Tanaman Cabai Merah *Capsicum annuum* L terhadap Cucumber Mosaic Virus (CMV)**

Weny Musa<sup>1,\*</sup>, Hersanti<sup>2</sup>, Achmad Zainuddin<sup>3</sup>, and Roekmi-ati Tjokronegoro<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Science, State University of Gorontalo, 96114, Kotamadya Gorontalo

<sup>2</sup>Department of Pest and Plant Disease, Faculty of Farming, Padjadjaran University, Jatinangor 45643, Sumedang

<sup>3</sup>Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Science, Padjadjaran University, Jatinangor 45643, Sumedang

Received June 5, 2009; Accepted October 26, 2009

### ABSTRACT

The poriferasta-5.22E.25-trien-3 $\beta$ -ol compound of leaves of this plant *Clerodendrum paniculatum* has activity as an inducer agent of plant systemic resistance of red plant toward Cucumber Mosaic Viruses (CMV), the inhibition activity compound shows 82% inhibition activity at 300 ppm. The structure of these compound were determined on the basis of spectroscopic data including UV, IR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR and 2D-NMR

**Keywords:** Poriferasta-5.22E.25-trien-3 $\beta$ -ol, *Clerodendrum paniculatum*, induction of systemic resistance, CMV

### PENDAHULUAN

Di Indonesia tumbuhan *Clerodendrum paniculatum* dikenal dengan nama bunga pagoda termasuk famili Verbenacea/Lamiaceae. Kegunaan dan kandungan kimianya belum banyak di publikasi. Dalam penelitian kandungan kimia telah ditemukan senyawa golongan steroid tanpa aktivitas biologinya [1].

Tumbuhan bunga pagoda (*C. paniculatum*) adalah tanaman yang berasal dari Cina. Penelitian sebelumnya dari daun bunga pagoda menunjukkan ekstrak air daun bunga pagoda, dapat menginduksi ketahanan sistemik tanaman cabai merah (*Capsicum annum* L) dari serangan *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) yang mengganggu pertumbuhan tanaman dan hasil produksi dengan aktivitas penghambatan sebesar 69,44% [2]. Genus *Clerodendrum* lainnya yang telah dilaporkan memiliki aktivitas biologi sebagai agen penginduksi yaitu ekstrak daun *Clerodendrum aculeatum* mampu menginduksi tanaman tembakau cv Samsung NN terhadap virus pada seluruh bagian tanaman [3]. Hal yang sama ekstrak *Clerodendrum inerme* mampu menginduksi *Tobacco Mosaic Virus* (TMV) terhadap tanaman tembakau [4]. Penelitian-penelitian lain dari genus *Clerodendrum* yang telah dilaporkan protein sebagai agen penginduksi ketahanan sistemik tanaman dari serangan patogen. [4-6]

Pada penelitian ekstrak air daun *C. paniculatum* belum mengungkapkan ekstrak aktif termasuk dalam

golongan senyawa metabolit sekunder atau metabolit primer [2]. Sehingga pada penelitian ini dilakukan isolasi daun *C. paniculatum* yang dipandu dengan uji aktivitas sebagai agen penginduksi ketahanan sistemik tanaman cabai merah terhadap CMV.

Uji pendahuluan aktivitas agen penginduksi telah dilakukan terhadap ekstrak metanol dari daun *C. paniculatum* dengan mengaplikasikan ekstrak tersebut ke tanaman cabai yang telah mempunyai 4 lembar daun sejati diatas kotiledon, setelah 1 x 24 jam tanaman cabai tersebut di inokulasi dengan CMV. Hasil uji aktivitas ekstrak metanol memberikan aktivitas penghambatan sebesar 67,65%. Persentase penghambatan tersebut tidak berbeda jauh dengan ekstrak air daun *C. paniculatum* sebesar 69,44% [2]. Dengan demikian kajian sifat agen penginduksi ketahanan sistemik tanaman cabai merah terhadap CMV yang diisolasi dari daun *C. paniculatum* sangat menarik untuk dilakukan.

### METODE PENELITIAN

#### Bahan

Bahan kimia yang digunakan terdiri atas pelarut organik, silika gel GF254 untuk kromatografi lapis tipis, silika gel 60 (70-230 mesh) untuk kromatografi kolom gravitasi, silika gel 60 (230-400 mesh) untuk kromatografi kolom vakum serta pereaksi uji fitokimia,

\* Corresponding author. Tel/Fax : +62-85220230724/435-823939  
Email address : moesa\_wenny@yahoo.com

dan larutan buffer fosfat untuk uji hayati. Sedangkan bahan yang berasal dari tumbuhan berupa daun bunga pagoda *C. paniculatum*, dimana untuk uji hayati menggunakan tanaman cabai merah *C. annum*, karborundum, daun tembakau yang telah terinfeksi CMV2-RIV dan larutan buffer fosfat.

### Alat

Alat-alat yang digunakan adalah peralatan gelas dan instrumen pendukung yang biasa digunakan di Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam. Kromatografi vakum cair (KVC) menggunakan Si gel 60 (230-400 Mesh), kromatografi kolom grafitasi menggunakan Si gel 60 (70-230 Mesh), analisa KLT menggunakan plat KLT Kieselgel 60 GF<sub>254</sub> 0,25 mm. Pelarut yang digunakan semuanya berkualitas teknis yang terdestilasi.

### Prosedur Kerja

#### Ekstraksi dan Pemisahan

Sebanyak 7,2 kg daun bunga pagoda dimaserasi dengan metanol. Ekstrak metanol selanjutnya dipartisi dengan *n*-heksan, etil asetat, dan air. Ekstrak metanol dan fraksi-fraksi hasil partisi dilakukan uji hayati. Fraksi etil asetat yang prospektif pada uji hayati dilakukan pemisahan selanjutnya.

Terhadap fraksi etil asetat 200 g dilakukan pemisahan menggunakan kromatografi vakum cair adsorben silika gel (70-230 mesh) dengan eluen *n*-heksan-etil asetat secara bergradien, yaitu: 100 : 0 - 0 : 100 menghasilkan 9 fraksi E<sub>1</sub>-E<sub>9</sub>. Fraksi E<sub>3</sub> 450 mg dikromatografi kolom dengan eluen *n*-heksan : metal klorida : aseton (8,5 : 1 : 0,5) menghasilkan 7 fraksi yaitu E<sub>3,1</sub>-E<sub>3,7</sub>. Fraksi E<sub>3,4</sub> (43 mg) direkristalisasi menghasilkan senyawa murni berupa kristal jarum berwarna putih (25 mg) dengan titik leleh 146-148 °C. Setiap tahap pemisahan diuji hayati untuk menentukan senyawa agen penginduksi ketahanan sistemik pada tanaman cabai merah yang diinfeksi dengan CMV.

#### Uji Hayati Ekstrak Maserasi, Fraksi-fraksi Hasil Partisi dan Fraksi-fraksi Hasil Pemisahan

Ekstrak metanol dan fraksi-fraksi hasil partisi, yaitu *n*-heksan, etil asetat, dan fraksi air serta fraksi-fraksi hasil pemisahan diuji hayati dengan konsentrasi sebagai berikut: ekstrak metanol, *n*-heksan, etil asetat dan fraksi air dengan konsentrasi 9000 ppm, 6000 ppm dan 3000 ppm. Konsentrasi ini diambil merujuk pada penelitian sebelumnya konsentrasi 50% ekstrak air daun bunga pagoda setara dengan konsentrasi 6000 ppm ekstrak metanol daun bunga pagoda [2]. Untuk 9000 ppm dan 3000 ppm diambil sebagai perbandingan. Fraksi-fraksi hasil kolom vakum dibuat konsentrasi 900 ppm, 600 ppm dan 300 ppm, serta fraksi-fraksi kolom

pemisahan selanjutnya dibuat konsentrasi 450 ppm, 300 ppm dan 150 ppm. Konsentrasi ini diturunkan karena fraksi-fraksi yang akan diuji semakin murni dibandingkan dengan ekstrak kasar. Sebagai pembanding digunakan ekstrak air daun bunga pagoda dan air sebagai kontrol.

Ekstrak dan fraksi-fraksi yang diuji terlebih dahulu dicampur dengan karborundum yang bertujuan agar ekstrak dan fraksi-fraksi tersebut dapat terserap ke sel-sel tanaman tanpa menyebabkan kematian jaringan tanaman. Masing-masing ekstrak dan fraksi-fraksi tersebut dioleskan pada daun kesatu dan kedua di atas kotiledon pada tanaman cabai merah yang telah berumur 1 bulan, 30 menit kemudian dibilas dengan air. Setelah 24 jam dilakukan inokulasi CMV, yaitu dengan mengoleskan air perasan daun tembakau yang telah terinfeksi CMV2-RIV yang sudah dicampur dengan larutan buffer fosfat pada daun ketiga dan keempat (di atas kedua daun yang telah diaplikasikan dengan ekstrak dan fraksi-fraksi).

#### Pengamatan

Parameter yang diamati adalah:

1. Intensitas serangan penyakit :

$$I = \frac{\sum (n \times v)}{N \times V} \times 100\% \quad (1)$$

Keterangan:

- I = intensitas serangan
- n = jumlah tanaman dalam tiap kategori serangan
- v = nilai skala tiap kategori serangan
- V = nilai skala dari kategori serangan tertinggi
- N = banyaknya tanaman yang diamati

Skala serangan adalah [7].

- 0 = tanaman tidak menunjukkan gejala virus
- 1 = tanaman menunjukkan gejala mosaik sangat ringan, atau tidak ada penyebaran sistematis
- 2 = tanaman menunjukkan gejala mosaik sedang
- 3 = tanaman menunjukkan gejala mosaik atau belang berat tanpa penciutan atau kelainan bentuk daun
- 4 = gejala mosaik atau belang berat dengan penciutan atau kelainan bentuk daun
- 5 = gejala mosaik atau belang sangat berat dengan penciutan atau kelainan bentuk daun yang parah, kerdil atau mati.

2. Total luas area yang berada di bawah kurva perkembangan penyakit (*Area Under Diseases Progress Curve/AUDPC*) dihitung dengan menggunakan rumus [8]:

$$AUDPC = \sum_i^{n-1} \left[ \frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right] (t_{i+1} - t_i) \quad (2)$$

Keterangan :

- Y<sub>i+1</sub> = data pengamatan ke-i+1

$t_{i+1}$  = waktu pengamatan ke- $i+1$   
 $Y_i$  = data pengamatan ke- $i$   
 $t_i$  = waktu pengamatan ke- $i$

3. Persentase penghambatan penyakit CMV dihitung berdasarkan rumus:

$$P = \left( 1 - \frac{AUDPC_{perlakuan}}{AUDPC_{kontrol}} \right) \times 100\% \quad (3)$$

### Elusidasi Struktur

Senyawa hasil isolasi dielusidasi untuk menentukan struktur molekul senyawa aktif sebagai agen penginduksi ketahanan sistemik tanaman cabai merah dari serangan CMV, berdasarkan data IR,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , dan 2D NMR.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak 7,2 kg daun *C. paniculatum* dimaserasi dengan metanol pada suhu kamar selama 5 hari berturut-turut 5 x 24 jam, diperoleh ekstrak metanol 1,7 kg, fraksi *n*-heksan 941,89 g, fraksi etil asetat 211,80 g, dan fraksi air 333,32 g.

Ekstrak dan fraksi-fraksi hasil partisi yang diperoleh diuji hayati dan diuji fitokimia. Pengamatan intensitas serangan CMV pertama kali dilakukan pada saat munculnya gejala CMV pada cabai merah (masa inkubasi) dan diikuti dengan interval waktu pengamatan tiga hari sampai 5 kali pengamatan. Dari hasil lima kali pengamatan intensitas serangan CMV dihitung nilai AUDPC (*Area Under Diseases Progress Curve*). Perhitungan intensitas serangan CMV ditentukan berdasarkan persamaan (1). Selanjutnya seluruh data

intensitas digunakan untuk menghitung total luas area yang berada di bawah kurva perkembangan penyakit (AUDPC) dan persentase penghambatan penyakit CMV, yang masing-masing perhitungannya menggunakan persamaan (2) dan (3). Hasil pengamatan dipaparkan pada Tabel 1.

Dari hasil pengamatan pada Tabel 1, ekstrak metanol dan fraksi etil asetat yang memberikan respon yang tinggi dalam menginduksi ketahanan sistemik tanaman cabai merah. Kedua ekstrak dan fraksi tersebut sangat konsisten aktivitas penghambatannya, dari konsentrasi rendah ke konsentrasi tinggi, sebagai agen penginduksi ketahanan sistemik tanaman cabai merah terhadap CMV. Untuk dua fraksi lainnya tidak konsisten aktivitas penghambatannya dari konsentrasi rendah ke konsentrasi tinggi. Fraksi-fraksi tersebut adalah fraksi *n*-heksan dan fraksi air. Fraksi air untuk konsentrasi 6000 ppm tidak menunjukkan gejala penyakit CMV, sehingga masa inkubasi = ~, AUDPC = 0, dan aktivitas penghambatan 100%. Fraksi ini tidak memungkinkan untuk dilanjutkan ke tahap pemisahan selanjutnya karena dari ketiga konsentrasi yang diuji tidak memberikan aktivitas penghambatan yang konsisten. Oleh karena itu, fraksi yang dilanjutkan ke tahap pemisahan, yaitu fraksi etil asetat. Fraksi ini memperlihatkan aktivitas yang sangat tinggi, yaitu 96,53% untuk konsentrasi 3000 ppm dibandingkan dengan ekstrak metanol untuk konsentrasi yang sama dengan aktivitas penghambatan 94,73% lebih kecil penghambatannya dari fraksi etil asetat.

Pengamatan pada Tabel 1 terlihat semakin besar konsentrasi uji semakin kecil penghambatannya. Hal ini mengindikasikan senyawa yang terkandung pada daun *C. paniculatum* yang bersifat sebagai agen penginduksi

**Tabel 1.** Kemampuan Ekstrak Hasil Maserasi dan Partisi yang Berpotensi Sebagai Agen Penginduksi Ketahanan Sistemik Tanaman Cabai Merah Terhadap CMV

No.	Ekstrak dan Fraksi Konsentrasi	Masa Inkubasi (hari)	AUDPC	Penghambatan (%)
1	Ekstrak metanol 3000 ppm	7	30	94,73
2	Ekstrak metanol 6000 ppm	7	180	68,42
3	Ekstrak metanol 9000 ppm	7	210	63,15
4	Fraksi <i>n</i> -heksan 3000 ppm	7	219,9	61,58
5	Fraksi <i>n</i> -heksan 6000 ppm	19	19,95	96,5
6	Fraksi <i>n</i> -heksan 9000 ppm	7	169,5	70,26
7	Fraksi etil asetat 3000 ppm	7	19,8	96,53
8	Fraksi etil asetat 6000 ppm	7	189,9	66,68
9	Fraksi etil asetat 9000 ppm	7	210	63,16
10	Fraksi air 3000 ppm	13	105	81,58
11	Fraksi air 6000 ppm	~	0	100
12	Fraksi air 9000 ppm	7	45	92,11
13	Etanol	16	495	13,16
14	Kontrol	7	570	0
15	Daun bunga Pagoda	7	45	92,11

Ket ~ = tidak terbatas

0 = gejala tidak muncul sampai akhir pengamatan

Tabel 2. Kemampuan Fraksi-fraksi Hasil Pemisahan Etil Asetat yang Berpotensi sebagai Agen Penginduksi Ketahanan Sistemik Tanaman Cabai Merah terhadap CMV.

No.	Fraksi/konsentrasi	Masa Inkubasi (hari)	AUDPC	Penghambatan (%)
1	Fraksi E <sub>1</sub> 300 pp m	10	636	0,93
2	Fraksi E <sub>1</sub> 600 ppm	10	576	10,28
3	Fraksi E <sub>1</sub> 900 ppm	10	48	95,52
4	Fraksi E <sub>2</sub> 300 ppm	10	252	60,75
5	Fraksi E <sub>2</sub> 600 ppm	10	468	27,10
6	Fraksi E <sub>2</sub> 900 ppm	~	0	100
7	Fraksi E <sub>3</sub> 300 ppm	~	0	100
8	Fraksi E <sub>3</sub> 600 ppm	10	12	98,13
9	Fraksi E <sub>3</sub> 900 ppm	13	96	85,05
10	Fraksi E <sub>4</sub> 300 ppm	10	294	54,21
11	Fraksi E <sub>4</sub> 600 ppm	10	240	62,62
12	Fraksi E <sub>4</sub> 900 ppm	~	0	100
13	Fraksi E <sub>5</sub> 300 ppm	24	6	99,07
14	Fraksi E <sub>5</sub> 600 ppm	~	0	100
15	Fraksi E <sub>5</sub> 900 ppm	10	252	60,75
16	Fraksi E <sub>6</sub> 300 ppm	19	78	87,85
17	Fraksi E <sub>6</sub> 600 ppm	10	510	20,56
18	Fraksi E <sub>6</sub> 900 ppm	7	522	18,69
19	Fraksi E <sub>7</sub> 300 ppm	7	732	-14,02
20	Fraksi E <sub>7</sub> 600 ppm	7	444	30,84
21	Fraksi E <sub>7</sub> 900 ppm	7	738	-14,95
22	Fraksi E <sub>8</sub> 300 ppm	7	702	-9,35
23	Fraksi E <sub>8</sub> 600 ppm	10	552	14,02
24	Fraksi E <sub>8</sub> 900 ppm	10	468	27,11
25	Fraksi E <sub>9</sub> 300 ppm	7	444	30,84
26	Fraksi E <sub>9</sub> 600 ppm	10	492	23,36
27	Fraksi E <sub>9</sub> 900 ppm	10	510	20,56
28	Etanol	7	1158	-80,37
19	Kontrol	10	642	0
30	Daun bunga Pagoda	~	0	100

Ket ~ = tidak terbatas

0 = gejala tidak muncul sampai akhir pengamatan

ketahanan sistemik tanaman cabai merah bekerja tidak secara sinergisme. Sehingga konsentrasi fraksi hasil pemisahan pada tahap uji hayati selanjutnya diperkecil, dengan asumsi semakin murni ekstrak atau fraksi yang diuji semakin kecil konsentrasi yang digunakan.

Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak maserasi dan fraksi-fraksi hasil partisi positif terhadap uji triterpen dan steroid sedangkan untuk saponin dan alkaloid adalah negatif.

Fraksi etil asetat 200 g dilakukan pemisahan dengan kromatografi vakum cair dengan adsorben silika gel (70-230 mesh), eluen *n*-heksan-etilasetat secara bergradien 100:0 – 0:100 menghasilkan 9 fraksi, yaitu fraksi E<sub>1</sub>-E<sub>9</sub>, masing-masing sebanyak 50 mg, 70 mg, 430 mg, 635 mg, 550 mg, 685 mg, 745 mg, 795 mg, dan 895 mg). Fraksi-fraksi ini selanjutnya diuji hayati untuk melihat fraksi aktif sebagai agen penginduksi ketahanan

sistemik tanaman cabai merah. Hasil uji hayati terlihat pada Tabel 2.

Hasil pengamatan yang dipaparkan pada Tabel 2 diperoleh dua fraksi yang memiliki aktivitas penghambatan di atas 50%, serta konsisten dari konsentrasi rendah ke konsentrasi tinggi. Kedua fraksi tersebut adalah fraksi E<sub>3</sub> dan E<sub>4</sub>.

Dari kedua fraksi tersebut, fraksi E<sub>3</sub> menunjukkan aktivitas penghambatan yang lebih tinggi dibandingkan fraksi E<sub>4</sub> untuk ketiga konsentrasi yang diuji. Untuk fraksi E<sub>3</sub> dengan konsentrasi 300 ppm dan fraksi E<sub>2</sub> 900 ppm memberikan aktivitas yang sama, yaitu tidak menunjukkan gejala mosaik sehingga aktivitas penghambatannya 100%. Hal ini disebabkan oleh hasil pemisahan etil asetat di antara fraksi-fraksi masih belum murni, sehingga memungkinkan dalam dua fraksi bisa memberikan aktivitas penghambatan yang sama. Namun untuk fraksi E<sub>2</sub> dianggap kurang aktif

**Tabel 3.** Kemampuan Fraksi-fraksi Hasil Pemisahan Fraksi E<sub>3</sub> yang Berpotensi Sebagai Agen Penginduksi Ketahanan Sistemik Tanaman Cabai Merah Terhadap CMV

No.	Fraksi/konsentrasi	Masa Inkubasi (hari)	AUDPC	Penghambatan (%)
1	Fraksi E <sub>3.1</sub> 150 ppm	16	36	92
2	Fraksi E <sub>3.1</sub> 300 ppm	~	0	100
3	Fraksi E <sub>3.1</sub> 450 ppm	16	564	-11,90
4	Fraksi E <sub>3.2</sub> 150 ppm	21	12	97,62
5	Fraksi E <sub>3.2</sub> 300 ppm	13	288	42,86
6	Fraksi E <sub>3.2</sub> 450 ppm	10	102	79,76
7	Fraksi E <sub>3.3</sub> 150 ppm	16	90	82,14
8	Fraksi E <sub>3.3</sub> 300 ppm	10	156	69,04
9	Fraksi E <sub>3.3</sub> 450 ppm	10	60	88
10	Fraksi E <sub>3.4</sub> 150 ppm	21	24	95,23
11	Fraksi E <sub>3.4</sub> 300 ppm	16	54	89,28
12	Fraksi E <sub>3.4</sub> 450 ppm	13	228	54,76
13	Fraksi E <sub>3.5</sub> 150 ppm	13	234	53,57
14	Fraksi E <sub>3.5</sub> 300 ppm	10	336	33,33
15	Fraksi E <sub>3.5</sub> 450 ppm	10	762	-51,19
16	Fraksi E <sub>3.6</sub> 150 ppm	10	240	52,38
17	Fraksi E <sub>3.6</sub> 300 ppm	7	852	-69,05
18	Fraksi E <sub>3.6</sub> 450 ppm	10	282	44,05
19	Fraksi E <sub>3.7</sub> 150 ppm	7	336	33,33
20	Fraksi E <sub>3.7</sub> 300 ppm	7	840	-66,66
21	Fraksi E <sub>3.7</sub> 450 ppm	7	780	-54,76
22	Etanol	10	498	1,19
23	Daun pagoda	10	198	60,71
24	Kontrol	10	504	0

Ket ~ = tidak terbatas

0 = gejala tidak muncul sampai akhir pengamatan

sebagai agen penginduksi ketahanan sistemik tanaman cabai merah, disebabkan tiga konsentrasi yang di uji tidak memberikan hasil yang konsisten.

Hal yang sama terjadi pada fraksi-fraksi lain, yaitu fraksi E<sub>1</sub>, E<sub>5</sub>, dan E<sub>6</sub>, di mana dari ketiga konsentrasi yang diuji tidak memberikan aktivitas penghambatan yang konsisten. Hasil uji hayati ini, menunjukkan fraksi aktif sebagai agen penginduksi ketahanan sistemik tanaman cabai merah adalah fraksi E<sub>3</sub>.

Untuk bisa mendapatkan senyawa murni sebagai agen penginduksi ketahanan sistemik tanaman cabai merah, terhadap fraksi E<sub>3</sub> dipisahkan kembali menggunakan kromatografi kolom.

Fraksi E<sub>3</sub> sebanyak 450 mg yang dikromatografi kolom dengan eluen *n*-heksan : metil klorida : aseton (8,5 : 1 : 0,5) menghasilkan 7 fraksi, yaitu E<sub>3.1</sub>-E<sub>3.7</sub>, masing-masing sebanyak 20 mg, 32 mg, 36 mg, 43 mg, 62 mg, 81 mg, dan 94 mg. Selanjutnya fraksi-fraksi hasil pemisahan diuji hayati, di mana hasil uji hayati disajikan pada Tabel 3.

Dari hasil pengamatan yang dipaparkan pada Tabel 3, diperoleh aktivitas penghambatan yang berbeda-beda dari setiap fraksi yang diuji. Fraksi E<sub>3.7</sub> aktivitas penghambatannya di bawah 50%, sedangkan fraksi-fraksi lainnya, yaitu E<sub>3.1</sub>, E<sub>3.2</sub>, E<sub>3.3</sub>, E<sub>3.4</sub>, E<sub>3.5</sub>, dan E<sub>3.6</sub>, secara umum memberikan aktivitas penghambatan yang bervariasi dari ketiga konsentrasi yang di uji. Dari fraksi-fraksi tersebut diperoleh satu fraksi yang memiliki

aktivitas penghambatan di atas 50%, serta konsisten dari konsentrasi rendah ke konsentrasi tinggi, yaitu fraksi E<sub>3.4</sub> (43 mg). Selanjutnya, fraksi E<sub>3.4</sub> dimurnikan dengan rekristalisasi menghasilkan senyawa murni berupa kristal jarum berwarna putih (25 mg) dengan titik leleh 146-148 °C. Terhadap senyawa hasil rekristalisasi selanjutnya dan dilakukan uji hayati untuk melihat apakah hasil rekristalisasi masih aktif sebagai agen penginduksi ketahanan sistemik tanaman cabai merah dari serangan CMV. Hasil pengujiannya ditabelkan pada Tabel 4.

Hasil uji hayati pada Tabel 4, fraksi pada konsentrasi 300 ppm menunjukkan aktivitas penghambatan di atas 50% untuk keseluruhan fraksi. Isolat senyawa murni memberikan aktivitas yang tinggi dibandingkan dengan fraksi-fraksi yang belum murni.

Aktivitas isolat senyawa murni yang dilarutkan dengan etanol maupun air pada konsentrasi 300 ppm memperlihatkan aktivitas penghambatan 82% dan 87%. Hal ini membuktikan semakin murni bahan uji maka aktivitasnya semakin tinggi. Adanya senyawa-senyawa lain dalam bahan uji akan menurunkan aktivitas, sehingga diperkirakan di antara senyawa-senyawa tersebut terdapat mekanisme kerja yang antagonis.

Hasil penelitian ini telah membuktikan bahwa agen penginduksi ketahanan sistemik tanaman dari serangan virus bukan dari golongan senyawa metabolit

**Tabel 4.** Kemampuan Fraksi-fraksi E<sub>3,4</sub> Hasil Rekristalisasi yang Berpotensi sebagai Agen Penginduksi Ketahanan Sistemik Tanaman Cabai Merah terhadap CMV

No.	Isolat, Fraksi/konsentrasi	Masa Inkubasi (hari)	AUDPC	Penghambatan (%)
1	Isolat + air 150 ppm	16	76	79
2	Isolat + air 300 ppm	19	46	87
3	Isolat + air 450 ppm	19	98	73
4	Isolat + etanol 150 ppm	16	114	69
5	Isolat + etanol 300 ppm	19	64	82
6	Isolat + etanol 450 ppm	10	296	20
7	Fraksi E <sub>3,4,1</sub> 150 ppm	10	228	38
8	Fraksi E <sub>3,4,1</sub> 300 ppm	16	112	69
9	Fraksi E <sub>3,4,1</sub> 450 ppm	13	119	68
10	Fraksi E <sub>3,4,2</sub> 150 ppm	19	54	85
11	Fraksi E <sub>3,4,2</sub> 300 ppm	10	168	54
12	Fraksi E <sub>3,4,2</sub> 450 ppm	7	332	10
13	Etanol	7	486	-30
14	Kontrol	7	372	0
15	Daun pagoda	19	146	60

primer saja tetapi memungkinkan juga dari golongan senyawa metabolit sekunder. Di mana hasil-hasil penelitian sebelumnya pada genus *Clerodendrum* terdapat senyawa aktif yang berukuran 34 kDa pada tanaman tembakau yang diinduksi dengan *C. aculeatum*. Sedangkan pada tanaman kontrol yang tidak diinduksi dengan ekstrak *C. aculeatum* tidak ditemukan senyawa aktif yang berukuran 34 kDa adalah protein [3]. Glikoprotein CIP-29 dan CIP-34 yang diisolasi dari daun *C. inermis* yang dapat menginduksi ketahanan sistemik tanaman tembakau terhadap TMV (*Tobacco Mosaic Virus*) [4]. Masing-masing protein tersebut menginduksi dengan derajat induksi yang berbeda, yaitu 16µg/mL untuk CIP-29 dan 800µg/mL untuk CIP-34. Protein CIP-29 adalah sebuah monomer dengan massa molekul 29 kDa, sedangkan protein CIP-34 merupakan kompleks dengan massa molekul 34 kDa. Hal yang sama diisolasi dari daun *C. inermis* menemukan protein Crip-31 yang menginduksi tanaman tembakau dari serangan CMV, *Potato Virus Y* (PVY) dan *Tomato Mosaic Virus* (ToMV) [6]. Dari genus *Amaranthus tricolor* diperoleh glikoprotein dengan massa molekul 27 kDa menghambat *Sunnehemp Rosette Virus* (SRV) ~ 98% [9]. Perbedaan dari hasil penelitian dengan hasil-hasil yang telah dilaporkan sebelumnya pada genus *Clerodendrum* terletak pada prosedur penelitian yang dilakukan. Dari penelitian-penelitian sebelumnya menggunakan prosedur pemisahan untuk mendapatkan protein. Sedangkan pada penelitian ini, prosedur penelitian yang dilakukan merupakan prosedur secara umum untuk isolasi mencari senyawa metabolit sekunder. Selain protein agen penginduksi ketahanan tanaman terhadap virus yang telah dilaporkan antara lain alkaloid yang diisolasi dari *Cynanchum komarovii*, senyawa tersebut adalah pirroloisokuinolinalkaloid, 2,3-dimetoksi-6-(3-okso-butyl)-7,9,10,11,11a,12-heksahidrobensol yang dapat menginduksi secara sistemik terhadap *Tobacco*

*Mosaic Virus* (TMV) [10]. GA 5-O-β-D-silopiranosa dapat menghambat *Prunus Necrotic Ringspot Virus* (PNRSV) pada tanaman tomat [11]. Oligokitosan dapat menghambat pertumbuhan TMV pada daun tembakau [12]. Hasil uji fitokimia untuk fraksi E<sub>3</sub> menunjukkan hasil positif (+) terhadap triterpen dan steroid.

#### ELUSIDASI STRUKTUR

Senyawa hasil isolasi dielusidasi struktur molekulnya berdasarkan data IR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR dan 2D NMR. Dari analisis spektroskopi IR, <sup>1</sup>H-NMR dan <sup>13</sup>C-NMR senyawa yang diisolasi dan dipandu dengan uji hayati, menghasilkan senyawa agen penginduksi ketahanan sistemik tanaman cabai merah yang diinfeksi dengan CMV. Berdasarkan analisa data, senyawa tersebut adalah golongan steroid dengan posisi gugus fungsi diketahui berdasarkan analisis spektroskopi NMR 2D.

Senyawa agen penginduksi yang diperoleh berupa kristal jarum tak berwarna dengan titik leleh 146-147 °C. Spektrum infra merah menunjukkan adanya pita-pita serapan untuk gugus hidroksil ( $\nu_{\text{maks}}$  3429 cm<sup>-1</sup>), C-H sp<sup>2</sup> ( $\nu_{\text{maks}}$  2893 cm<sup>-1</sup>), C-H alifatik ( $\nu_{\text{maks}}$  2935 cm<sup>-1</sup>), C=C terkonyugasi ( $\nu_{\text{maks}}$  1643 cm<sup>-1</sup>), C=C terisolasi ( $\nu_{\text{maks}}$  1458 cm<sup>-1</sup>), dan C-O alkohol ( $\nu_{\text{maks}}$  1056 cm<sup>-1</sup>), serta yang merupakan ciri khas kerangka dasar siklopentano perhidrofenantren ( $\nu_{\text{maks}}$  1377 cm<sup>-1</sup>). Analisis secara terperinci spektrum NMR menunjukkan adanya 29 sinyal karbon, sinyal-sinyal tersebut terdiri atas lima karbon metil masing-masing pada  $\delta_c$  12,2 (C-18); 19,6 (C-19); 20,4 (C-21); 21,0 (C-27); dan 12,3 ppm (C-29). Selanjutnya dari spektrum <sup>13</sup>C NMR mengandung 10 karbon metilen masing-masing pada  $\delta_c$  37,4 (C-1); 31,7 (C-2); 42,4 (C-4); 31,8 (C-7); 21,2 (C-11); 28,9 (C-12); 24,5 (C-15); 40,4 (C-16); 109,7 (C-26); dan 25,9 ppm (C-28), 10 karbon metin masing-

**Tabel 5.** Pergeseran kimia karbon isolat murni (I), Kolesterol (II\*) dan stigmasterol (III\*\*) dari spektrum Resonansi Magnet inti karbon -13

No. C	I Pergeseran Kimia <sup>13</sup> C Isolat Murni C <sub>29</sub> H <sub>46</sub> O (ppm)	II Pergeseran Kimia <sup>13</sup> C Kolesterol C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O (ppm)	III Pergeseran Kimia <sup>13</sup> C Stigmasterol C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O (ppm)
1	37,4	37,5	37,21
2	31,7	31,6	31,69
3	72,0	71,3	71,81
4	42,4	42,4	42,35
5	141,0	141,2	140,80
6	121,9	121,3	121,69
7	31,8	32,0	31,94
8	32,0	32,3	31,94
9	50,3	50,5	50,20
10	36,7	36,5	36,56
11	21,2	21,2	21,11
12	28,9	28,3	39,74
13	42,5	42,4	42,35
14	57,0	56,9	56,91
15	24,5	24,3	24,39
16	40,4	40,0	28,96
17	56,0	56,5	56,06
18	12,2	12,0	12,07
19	19,6	19,4	19,42
20	39,8	35,8	40,54
21	21,0	18,8	21,11
22	130,2	36,4	138,37
23	137,4	24,1	129,32
24	52,2	39,6	51,29
25	148,8	28,0	31,49
26	109,7	22,8	21,26
27	20,4	22,5	19,02
28	25,9		25,44
29	12,3		12,17

masing pada  $\delta_C$  72,0 (C-3); 121,9 (C-6); 32,0 (C-8); 50,3 (C-9); karbon kuarternier yang masing-masing muncul pada  $\delta_C$  141,0 (C-5); 36,7 (C-10); 42,5 (C-13); dan 57,0 (C-14); 56,0 (C-17); 39,8 (C-20); 130,2 (C-22); 137,4 (C-23); dan 52,2 ppm (C-24), dan empat 148,8 ppm (C-25), Hal ini menunjukkan bahwa struktur molekul senyawa 1 terdiri atas kerangka dasar steroid, satu ikatan C=C di dalam cincin, satu gugus hidroksil yang terikat pada cincin, dan dua ikatan C=C terkonyugasi pada rantai samping.

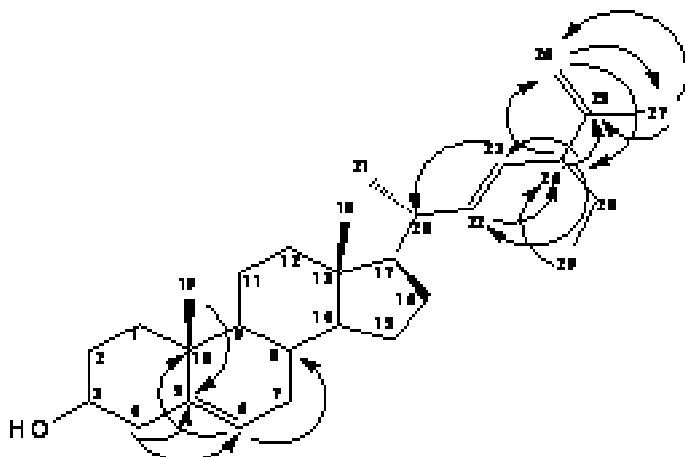
Spektrum <sup>1</sup>H NMR menunjukkan adanya lima sinyal dari proton vinilik yang muncul pada  $\delta_H$  4,50-5,50 ppm. Sinyal pada  $\delta_H$  5,35 ppm (1H, d, J = 4,8), khas untuk proton vinilik dalam kerangka dasar steroid. Dua sinyal proton vinilik yang terikat pada satu atom karbon

muncul pada  $\delta_H$  4,69 ppm (1H, d, J = 4,8) dan 4,70 ppm (1H, d, J = 4,8).

Hal ini disebabkan kedua proton tersebut terikat pada atom karbon sp<sup>2</sup> yang kaku sehingga tidak terjadi perputaran cepat antara kedua proton. Dua proton vinilik lain muncul masing-masing pada  $\delta_H$  5,17 ppm (1H, m) dan 5,19 ppm (1H, m). Hal ini menunjukkan bahwa empat proton vinilik terdapat pada rantai samping steroid, dua proton metin dan satu proton metilen, serta terdapat dua ikatan C=C pada rantai samping tersebut. Sinyal proton pada  $\delta_H$  3,52 ppm (1H, m) adalah khas untuk proton metin pada kerangka dasar steroid yang terikat gugus hidroksil. Pergeseran kimia karbon senyawa aktif dengan data literatur ditunjukkan pada Tabel 5 sedangkan spektrum-spektrum <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMQC dan <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC ditunjukkan

**Tabel 6.** Korelasi proton dan karbon senyawa hasil isolat berdasarkan spektrum  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC dan  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC

No. C	$\delta_c$ (ppm)	Jenis C	$\delta_H$ (ppm) HMQC	$\delta_c$ (ppm) HMBC
24	52,2	CH	2,41(1H,m)	130,2 (C-22); 137,4 (C-23); 148,8 (C-25); 25,9 (C-28)
26	109,7	CH <sub>2</sub>	4,68 (1H,s); 4,69(1H,s)	20,4 (C-27); 52,2 (C-24)
29	12,3	CH <sub>3</sub>	0,83 (3H,s)	25,9 (C-28)

**Gambar 1.** Korelasi HMBC senyawa poriferasta-5,22E,25-trien-3β-ol

pada tabel 6.

Berdasarkan analisis data spektroskopi UV, IR, dan NMR dapat disimpulkan bahwa senyawa aktif adalah poriferasta-5,22E,25-trien-3β-ol, dengan rumus molekul  $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}$ , di mana data tersebut dibandingkan dengan data literatur [13]. Dari perbandingan data tersebut, struktur senyawa aktif yang diusulkan sebagaimana terlihat pada Gambar 1.

## KESIMPULAN

Senyawa poriferasta-5,22E,25-trien-3β-ol telah diisolasi untuk pertama kali dari daun *C. Paniculatum* yang memiliki aktivitas sebagai agen penginduksi ketahanan sistemik tanaman cabai merah terhadap *cucumber mosaic virus* (CMV). Penemuan senyawa ini memiliki arti penting pada kemotaksonomi *Clerodendrum* karena dalam genus ini telah dilaporkan senyawa agen penginduksi ketahanan tanaman terhadap patogen adalah protein.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada staf Puspitek Kimia LIPI Serpong yang telah membantu pengukuran spektrum NMR ID dan 2D, dan juga kepada staf Herbarium Bogoriensi yang telah mengidentifikasi spesimen ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Hsu, Y.C., Chen, C., Yuh, P., and Hsu, H.Y., 1983, *albiflorum Hemsl.*, 21, 26.
- Hersanti, 2004, *Bionatura*, 6, 3, 285-293.
- Verma, H.N., Shalini, S., Varsha, and Dharendra, K., 1996, *Phytopathology*, 86, 5, 485-492.
- Vivek, P., Shalini, S., Varsha., and Verma, H.N., 1995, *Plant Sci.*, 110, 73-82.
- Fabiola, O., Vivek, P., Paola, Valbonesi, and Shalini, S., 1996, *FEBS Lett.*, 396, 132-134.
- Shelly, P., Savarni, T., and Anupam, V., 2001, *Plant Sci.*, 161, 453-459.
- Dolores, L.M., 1996, *Management of Pepper Viruses*, AVNET-II Final Workshop Proceedings, AVDRC, Tainan, Taiwan, 334-342.
- Louws, F. J., Mary, K.H., John, F.K., and Cristine, T.S., 1996, *Plant Dis.*, 80, 1251-1256.
- Sribash, R., Sadhana, P., Begum, M., Kumar, S., Lodha, M.L., and Kapoor, H.C., 2006, *Phytochem.*, 67, 17, 1865-1873.
- Tian-ying, An., Run-qiu, H., Zhao, Y., Dian-kun, Z., Guang-ren, L., Yu-cheng, Y., and Jun, G., 2001, *Phytochem.*, 57, 7, 1135-1139.
- Joaquin, F., Maria, B.J., Pilar, L-G.M., Jaime, P., and Vicente, C., 2006, *Phytochem.*, 67, 142-148.
- Xiaoming, Z., Xiaoping, S., Yuguang, D., and Xinmiao, L., 2007, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 87, 78-84.
- Pratul, G., Jibon, K., Ze-Nai, C., and Yang, L., 1995, *Phytochem.*, 41, 1, 279-281.