

**LAPORAN AKHIR
PENELITIAN DASAR
UNIVERSITAS LAMPUNG**



**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA BIOAKTIF DARI KAYU AKAR
TUMBUHAN DATUAN (*Ficus vasculosa* Wall Ex Miq) SERTA UJI
BIOAKTIVITASNYA SEBAGAI ANTIFEEDANT**

TIM PENGUSUL :

- 1. Syaiful Bahri, M.Si**
NIDN : 0025087305
ID SINTA : 6131642
- 2. Dr. Yuli Ambarwati, M.Si**
NIDN : 0217077401
ID SINTA : 6137975
- 3. Dr. Endah Setyaningrum, M.Biomed.**
NIDN : 0017056403
ID SINTA : 6664668

Nomor Kontrak : 677/UN 26.21/PN/2022

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG**

2022

**HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR
PENELITIAN DASAR UNIVERSITAS LAMPUNG**

Judul Penelitian : Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Bioaktif dari Kayu Akar Tumbuhan
Datuan (*Ficus vsculosa* Wall Ex. Miq) serta Uji Bioaktivitasnya Sebagai
Antifeedant

Ketua Peneliti :

a. Nama Lengkap : Syaiful Bahri, M.Si
b. NIDN : 0025087305
c. SINTA ID : 6131642
d. Jabatan Fungsional : Lektor
e. Program Studi : Kimia
f. Nomor HP : 085722985141
g. Alamat surel (e-mail) : syaiful.bahri@fmipa.unila.ac.id

Anggota Peneliti (1)

a. Nama Lengkap : Dr.Yuli Ambarwati, M.Si
b. NIDN : 0217077401
c. SINTA ID : 6137975
d. Program Studi : Kimia

Anggota Peneliti (2)

a. Nama Lengkap : Dr. Endah Setyaningrum, M. Biomed.
b. NIDN : 0017056403
c. SINTA ID : 6664668
d. Program Studi : Biologi

Jumlah Mhs yang terlibat : 1 Mahasiswa

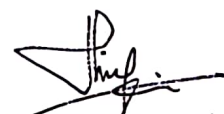
Lanang Rachmadi (1817011040) /Kimia/
lanangrachmaditengker@gmail.com

Lokasi kegiatan : Jurusan Kimia FMIPA UNILA
Lama Kegiatan : 6 Bulan
Biaya Penelitian : Rp. 25.000.000,-
Sumber Dana : DIPA BLU UNILA

Bandar Lampung, 23 September 2022



Ketua Peneliti,



Syaiful Bahri, M.Si.
NIP. 197308252000031001

Menyetujui,
Ketua LPPM Unila



Prof. Dr. Lismailia Afriani, D.E.
NIP. 196505101993032008



DAFTAR ISI

DAFTAR ISI

ABSTRAK

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang.....	5
1.2 Tujuan Khusus Penelitian	6
1.3 Urgensi Penelitian.....	6

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 <i>State of The Art</i>	7
2.2 Studi Pendahuluan yang telah dilaksanakan	10

BAB 3. METODE

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	11
3.2 Alat dan Bahan	11
3.3 Tahapan Penelitian.....	11

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Ekstraksi Sampel Kayu Akar Tumbuhan Datuan	15
4.2 Pemurnian dengan Kromatografi Kolom.....	16
4.3 Analisis melalui Uji KLT	17
4.4 Pengujian Bioaktivitas terhadap Ekstrak Kasar dan Isolat Kristal	18
4.5 Analisis menggunakan Spektrofotometer UV	19
4.6 Analisis menggunakan Spektroskopi IR.....	21
4.7 Analisis menggunakan Spektroskopi Massa (MS)	21

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan	25
5.2 Saran.....	25

DAFTAR PUSTAKA

ABSTRAK

Potensi senyawa bioaktif yang terdapat pada tumbuhan datuan (*Ficus Vasculosa* Wall. Ex Miq) telah menarik minat di bidang penelitian karena terdapat korelasi yang unik antara senyawa kimianya dengan bioaktivitasnya. Tujuan dari penelitian ini yakni mengisolasi senyawa steroid dari ekstrak kayu akar tumbuhan datuan tersebut dan diuji bioaktivitasnya sebagai *antifeedant* terhadap hama kubis-kubisan (*Plutella xylostella*). Sampel kayu akar dari tumbuhan datuan tersebut dipreparasi untuk dimaserasi dengan pelarut metanol, diuji kandungan fitokimianya terhadap ekstrak kasarnya, dilanjutkan dengan pemisahan menggunakan kromatografi cair vakum (KCV) dan kromatografi kolom (KK), serta pemurnian dengan kromatografi lapis tipis (KLT) untuk memperoleh senyawa isolat murni. Ekstrak kasar (uji pendahuluan) maupun senyawa isolat murni tersebut diujikan sebagai *antifeedant* terhadap hama kubis-kubisan (*Plutella xylostella*) untuk mengetahui sifat bioaktivitasnya serta dilanjutkan dengan karakterisasi titik lelehnya maupun analisis menggunakan spektrofotometer UV, spektroskopi IR, dan MS untuk keperluan elusidasi struktur. Hasil senyawa isolat yang diperoleh dari fraksi non-polar ekstrak kasar yang digolongkan sebagai steroid berdasarkan uji fitokimia dengan warna hijau tua dengan nilai $R_f = 0,5$ dalam n-heksana: aseton (8:2); dan nilai $R_f = 0,9$ dalam etil asetat : aseton (8:2). Senyawa isolat didapatkan berupa kristal berwarna putih sebanyak 10 mg dengan titik lelehnya yaitu 145 – 150 °C. Selain itu, senyawa isolat tersebut memiliki serapan UV dengan panjang gelombang maksimum dan nilai absorbansi (A) yakni 202,5 nm dengan $A = 0,919$; diikuti dengan panjang gelombang lainnya yaitu 271,5 nm dengan $A = 0,057$; dan 281,5 dengan $A = 0,060$. Absorbansi pada panjang gelombang tersebut diindikasikan berasal dari auksokrom hidroksil pada kromofor yang menyebabkan eksitasi elektron $n \rightarrow \pi^*$. Adanya gugus O-H tersebut relevan dengan serapan pada FTIR pada bilangan gelombang 3425 cm^{-1} , dan 1053 cm^{-1} (khas berasal dari β -sitosterol), yang didukung juga dengan serapan gugus fungsi lain seperti C-H sp^3 (2935 cm^{-1}), C-H sp^2 (2866 cm^{-1}), dan C=C non-konjugasi (1639 cm^{-1}), serta C-H sp^3 dari isopropil (1465 cm^{-1} dan 1380 cm^{-1}). Hasil analisis dengan MS diperoleh bahwa senyawa tersebut mempunyai bobot molekul m/z (M^+) = 414 yang diproyeksikan memiliki rumus kimia $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2$ dengan nilai DBE = 5, yang mengindikasikan adanya 4 struktur silik dan 1 ikatan rangkap non-konjugasi. Berdasarkan hasil analisis tersebut, dikategorikan sebagai senyawa (3 β , 5 α , 24R)-stigmasta-7-en-3-ol atau β -sitosterol yang memiliki bioaktivitas sebagai *antifeedant* terhadap hama (ulat) kubis-kubisan dengan parameter pada 24 jam (2 hama ulat masih hidup dan 1 mati), dan 48 jam (1 hama ulat mati dan 1 menjadi kepompong). Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa senyawa yang diisolasi dari kayu akar tumbuhan datuan memiliki bioaktivitas sebagai *antifeedant* terhadap hama kubis-kubisan tersebut.

Kata kunci : *Antifeedant*, Datuan, Kayu Akar, *Plutella xylostella*, Steroid

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Eksplorasi senyawa bioaktif sebagai bahan baku biopestisida dari bahan alam telah menarik minat di bidang penelitian secara signifikan karena terdapat korelasi yang unik antara senyawa kimia dengan bioaktivitasnya (Sandabe *et al.*, 2006; Chawla *et al.*, 2012; Mawa *et al.*, 2013). Misalnya, pemanfaatan bagian dari tumbuhan Datuan (*Ficus Vasculosa* Wall. Ex Miq) seperti buah, kayu, kulit kayu, akar, dan daunnya baik dalam bentuk produk kering maupun segar telah diaplikasikan sebagai obat-obatan tradisional (Gargiullo, 2005), antioksidan (Shi *et al.*, 2011), biopestisida (Bahri *et al.*, 2021), dan sebagainya (Qian-Wei *et al.*, 2016).

Di Indonesia, tumbuhan yang memiliki genus *Ficus* dan famili *Moraceae* ini dikenal dengan sebutan Datuan (Lampung Utara, Indonesia), dalam bahasa lain dikenal dengan istilah Burut, Huru Awis, Ki Kopeng, Ki Kuya (Sunda), serta secara umum dikenal juga dengan sebutan fig (Inggris), ara (Malaysia), dan nama lainnya (Hendrayana *et al.*, 2016).

Sejauh ini, beberapa senyawa bioaktif seperti senyawa fenolik, flavonoid, terpenoid, dan steroid telah diisolasi dari tumbuhan Datuan (*Ficus*) (Chen *et al.*, 2010). Mawa *et al.*, (2013) mengulas bahwa senyawa-senyawa bioaktif yang terdapat pada tumbuhan Datuan tersebut memiliki beragam bioaktivitas seperti antioksidan, antikanker, hepatoprotektif, hipoglikemik, hipolipidemik, antibakteri, antipiretik, antituberkulosis, potensi iritan, anthelmintik, antimutagenik, dan anti-HSV. Namun, hasil ulasan tersebut hanya terbatas pada pelaporan di bidang farmakologi.

Selain itu, Bahri *et al.*, (2020) melaporkan bahwa senyawa fenil propanoid ditemukan di bagian kulit akar tumbuhan Datuan, tetapi dalam pengujian senyawa tersebut sebagai antibakteri terhadap *Escherichia coli* tidak aktif karena tidak memiliki respon dalam menghambat pertumbuhan bakteri tersebut, dan diameter zona inhibisinya tidak terbentuk (< 10 mm) sehingga dikategorikan tidak ada respon sebagai antibakteri.

Penelitian lanjutan dari Bahri *et al.*, (2021) melaporkan bahwa terdapat senyawa golongan steroid yang diisolasi dari kulit batang tumbuhan Datuan dan memiliki bioaktivitas sebagai *attractant* terhadap hama gudang (*Sitophilus oryzae* L.) dengan % *attractive* sebesar 71,67% dan *attractive index* (AI) sebesar 0,63 (dikategorikan sebagai *attractant*). Namun, eksplorasi hanya berfokus pada bagian kulit batang tumbuhan Datuan, sehingga diperlukan eksplorasi lebih lanjut untuk menemukan senyawa bioaktif lainnya.

Atas dasar informasi tersebut, maka peneliti tertarik untuk mengeksplorasi lebih lanjut dan mengisolasi senyawa bioaktif lainnya dari bagian kayu akar tumbuhan Datuan tersebut untuk diuji bioaktivitasnya sebagai *antifeedant* terhadap hama kubis-kubisan (*Plutella xylostella*).

1.2 Tujuan Khusus Penelitian

Berdasarkan latar belakang permasalahan penelitian ini, tujuan khusus penelitian ini dilakukan untuk mencapai target sebagai berikut :

1. Mengisolasi senyawa bioaktif dari bagian kayu akar tumbuhan Datuan (*Ficus Vasculosa* Wall. Ex Miq).
2. Memisahkan dan memurnikan senyawa isolat menggunakan kromatografi cair vakum (KCV), kromatografi lapis tipis (KLT), dan kromatografi kolom (KK).
3. Menguji ekstrak kasar (uji pendahuluan) dan senyawa isolat sebagai sebagai *antifeedant* terhadap hama kubis-kubisan (*Plutella xylostella*).
4. Melakukan elusidasi struktur senyawa isolat menggunakan spektrofotometer UV, spektroskopi IR, dan MS.

1.3 Urgensi Penelitian

Atas dasar permasalahan yang ditemukan seperti adanya hama kubis-kubisan yang mengganggu hasil panen sayuran, terbatasnya eksplorasi senyawa bioaktif dari yang diisolasi kayu akar tumbuhan Datuan, dan adanya potensi tumbuhan Datuan tersebut di Provinsi Lampung untuk dimanfaatkan. *Output* penelitian ini tidak hanya sebatas untuk publikasi jurnal semata, namun juga sebagai *roadmap* pengembangan lebih lanjut terkait pengadaan bahan baku senyawa aktif biopestisida sehingga dapat dimanfaatkan oleh para Petani di Provinsi Lampung secara khusus baik untuk pertanian maupun perkebunannya, serta pengembangan diversifikasi produk pestisida di bidang pertanian yang ramah lingkungan.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *State of The Art*

Datuan (*Ficus Vasculosa* Wall. Ex Miq) adalah tumbuhan dari ordo Marales, famili Moraceae, dan genus *Ficus* yang banyak ditemukan di daerah tropis dan subtropis di seluruh dunia (Gargiullo, 2005; Van Noort *et al.*, 2007). Di Indonesia terdapat lebih dari 500 spesies *Ficus* yang telah ditemukan dan tersebar paling luas di sekitar Sumatera 102 spesies, Kalimantan 106 spesies, Papua 99 spesies, Sulawesi 83 spesies, Jawa 75 spesies, Maluku 71 spesies, dan Nusa Tenggara dengan 36 spesies. Secara umum tumbuhan Datuan merupakan pohon berkayu besar yang tumbuh dengan morfologi tinggi 30-50 m dan diameter 90-110 cm seperti yang ditunjukkan pada **Gambar 1**. Pada seluruh bagian tumbuhannya mengandung getah berwarna putih susu atau kekuningan yang lengket, dan umunya disukai beberapa serangga seperti lebah/tawon, dan lainnya karena aromanya. Kulit batang luar dari tumbuhan ini memiliki morfologi yang halus, berwarna hijau sampai kelabu atau beberapa terdapat warna putih. Bagian cabang-cabangnya tumbuh di bagian atas, dan bagian akarnya berbentuk serabut yang berukuran besar. Tumbuhan ini memiliki daun tunggal berukuran kecil, mengkilap pada bagian atasnya, dan berbulu halus pada bagian bawahnya. Selain itu, tumbuhan ini memiliki buah yang berukuran kecil bulat, berwarna hijau yang terkumpul dalam satu kelompok (Yusuf, 2011).

Sejak awal dikenal oleh masyarakat, pemanfaatan dari bagian tumbuhan Datuan umumnya digunakan sebagai nutrisi kesehatan dan pengobatan secara farmakologis (Sandabe *et al.*, 2006; Mawa *et al.*, 2013), karena memiliki berbagai kandungan seperti vitamin, mineral, karbohidrat, gula, asam organik, senyawa fenolik, flavonoid, tanin, dan komposisi metabolit sekunder lainnya (Slatnar *et al.*, 2011; Chawla *et al.*, 2012).



Gambar 1. Tumbuhan Datuan (Bahri *et al.*, 2021)

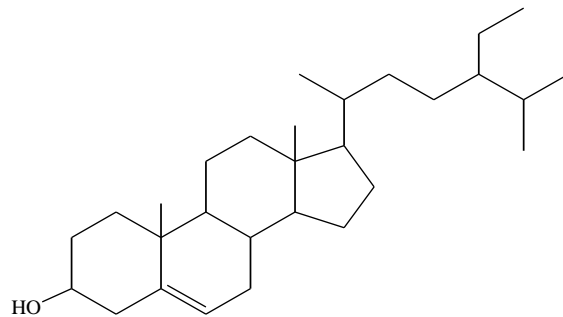
Sejauh ini, berbagai senyawa bioaktif seperti terpenoid (diterpen, triterpen), steroid, flavonoid, senyawa fenolik, antosianin, dan sebagainya telah diidentifikasi dari tumbuhan Datuan tersebut (Chawla *et al.*, 2012). Beberapa bagian secara spesifik juga dilaporkan mengandung beragam senyawa fitokimia seperti gula pereduksi, tanin, saponin, alkaloid, dan flavon aglikon (bagian kulit batang Datuan) (Sandabe *et al.*, 2006); asam oleat, asam linoleat, asam linolenat, asam palmitat, asam stearat, dan asam arakhidat (bagian biji Datuan kering); bergapten, 4',5'-dihidropsoralen, rutin, 24-metilensikloartanol umbelliferon, marmesin, stigmasterol, β -sitosterol, fikusogenin, lupeol, dan psoralen ψ -taraxasterol ester (bagian daun Datuan); 6-O-linoleil- β -D-glukosil- β -sitosterol, 6-O-Oleil- β -D-glukosil- β -sitosterol, 6-O-palmitoil- β -D-glukosil- β -sitosterol, resin, serin, albumin, gula, asam malat, renin, enzim proteolitik, enzim lipase, enzim katalase, dan enzim peroksidase (bagian getah Datuan); sianidin-3-O-glukosida, sianidin-3-Orhamnoglukosida, lemak jenuh, kolesterol, natrium, kalsium, protein, vitamin A, dan vitamin C (bagian buah Datuan); psoralen dan bergapten (bagan akar Datuan) (Chawla *et al.*, 2012). Putra *et al.*, (2020) juga mengulas mengenai potensi sekitar 40 spesies tumbuhan Datuan (*Ficus* spp.) yang ditemukan di Jawa dan memiliki senyawa bioaktif seperti alkaloid, fenol, flavonoid, tanin, saponin, terpenoid, steroid, glikosida, antosianin, dan sebagainya serta mempunyai beragam bioaktivitas seperti antioksidan, antibakteri, antiinflamasi, aktivitas sitotoksik, aktivitas anagesik, antidiabetes, hepatoprotektif, dan aktivitas farmakologis lainnya (Tabel 1).

Tabel 1. Senyawa bioaktif dari tumbuhan Datuan (*Ficus* spp.) dan uji bioaktivitasnya (Putra *et al.*, 2020)

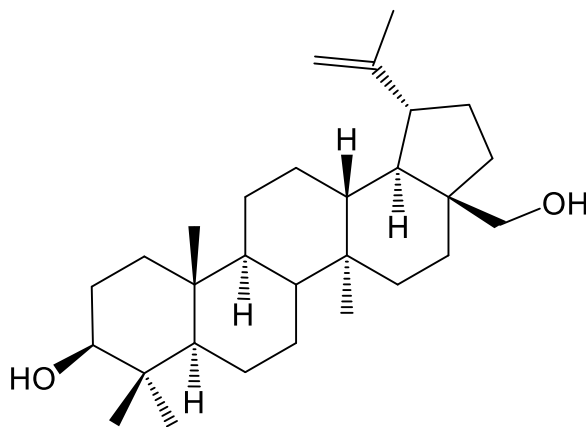
Nama Spesies	Bagian Tumbuhan	Senyawa Bioaktif	Bioaktivitas
<i>Ficus vasculosa</i> Wall. ex Miq.	Daun muda	Naringenin; asam valinat; asam 9,16-diokso-10,12,14-oktadekatrienoat; 2,6-dimetoksi-1, 4-benzoquinon; apigenin; dan Norartocarpetin	Antioksidan dan pereduksi stress oksidatif (Li <i>et al.</i> , 2019)
<i>Ficus carica</i> L.	Daun	Alkaloid, flavonoid, koumarin, saponin, polifenol, dan tannin	Antibakteri terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> (Arbi <i>et al.</i> , 2021)
		Asam hidroksibenzoat, asam hidroksisinamat, koumarin, furanokoumarin,	Antioksidan, antikanker, antidiabetes,

		senyawa volatil, dan aktivitas triterpenoid	hepatoprotektif, anticholinesterase, anti HSV-1, antibakteri, antiinflamasi (Li <i>et al.</i> , 2021)
	Buah	Kampesterol	Antiviral potensial terhadap HIV (Damayanti <i>et al.</i> , 2021)
	Batang	Alkaloid, dehidrotiloforin, dehidroantofin, dan tiloforidisin	Antimalarial (Kubo <i>et al.</i> , 2016)
<i>Ficus septica</i> Burm.f.	Kulit akar	Alkaloid	Anti DENV (Dengue Virus DBD) (Huang <i>et al.</i> , 2017)
	Daun	Flavonoid, saponin, triterpenoid, dan sterol	Larvisida terhadap <i>Artemia salina</i> (Aritan <i>et al.</i> , 2019)
<i>Ficus auriculata</i> Lour.	Daun muda	Fenol, flavonoid, isoflavonoid, turunan benzoat, dan tannin, kumarin, dan polisetilen	Herbisida potensial, antioksidan, dan antimikroba (Bertoletti <i>et al.</i> , 2018)

Beberapa senyawa bioaktif yang diisolasi dari tumbuhan Datuan (*F. vasculosa*) seperti β -sitosterol (1) (**Gambar 2**) telah dilaporkan memiliki bioaktivitas sebagai *attractant* (biopestisida) terhadap hama gudang (*S. oryzae* L.) (Bahri *et al.*, 2021), dan senyawa Betulina (2) (**Gambar 3**) memiliki bioaktivitas sebagai insektisida terhadap larva *C. quinquefasciatus* dengan LD₅₀ 16,44 mg/L (Qian-wei *et al.*, 2016). Namun seperti yang diulas oleh Mawa *et al.*, (2012) dan Kevin *et al.*, (2020) bahwa senyawa bioaktif yang diisolasi dari berbagai tumbuhan Datuan (spesies *Ficus* spp.) masih terbatas pada bidang farmakologi sehingga berpotensi untuk dieksplorasi lebih lanjut guna mengetahui kandungan senyawa bioaktif lainnya beserta bioaktivitasnya.



Gambar 2. Struktur senyawa β -sitosterol (**1**) dari tumbuhan Datuan (*F. vasculosa*) yang memiliki bioaktivitas sebagai *attractant* (Bahri *et al.*, 2021)



Gambar 3. Struktur senyawa Betulina (**2**) dari tumbuhan Datuan (*F. vasculosa*) yang memiliki bioaktivitas sebagai insektisida (Qian-wei *et al.*, 2016)

2.2 Studi Pendahuluan yang telah dilaksanakan

Bahri *et al.*, (2020) berhasil mengisolasi senyawa bioaktif golongan propanoid yaitu metil p-hidroksisinamat dari bagian kulit akar tumbuhan Datuan (*F. vasculosa*), namun tidak menunjukkan bioaktivitas antibakteri terhadap *E. coli*, dimana zona inhibisi < 10 mm yang dikategorikan tidak ada respon. Selain itu, penelitian lanjutan dari Bahri *et al.*, (2021) telah berhasil mengisolasi senyawa bioaktif golongan steroid yakni (3 β ,24S)-stigmast-5-en-3-ol (β -sitosterol) dari bagian kulit batang tumbuhan Datuan (*F. vasculosa*) dan terbukti memiliki bioaktivitas sebagai *attractant* terhadap hama gudang (*S. oryzae* L.) dengan nilai % *attractive* (71,67%) dan *attractive index* (AI) (0,63), dimana $\geq 0,2$ dikategorikan sebagai *attractant*.

Berdasarkan potensi dan dasar tersebut, maka pada penelitian ini perlu dilakukan guna mengeksplorasi senyawa bioaktif dari bagian kayu akar tumbuhan Datuan tersebut dan diuji bioaktivitasnya sebagai *antifeedant*.

BAB 3. METODE

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan dari bulan April sampai Oktober 2022 di Laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia FMIPA Unila. Analisis sampel menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan FT-IR akan dilakukan di Laboratorium Instrumentasi FMIPA Pendidikan Kimia UPI Bandung, sedangkan analisis menggunakan GC-MS dilakukan di Laboratorium Kimia Organik UGM, Yogyakarta.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat-alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain alat-alat gelas berbagai ukuran, plat porselen, plat kromatografi (Merck TLC G-60 F-254) dengan bejana pengembang, penguap putar vakum Heidolph VV2000, cawan petri, mesin penggiling, neraca analitik Wigen Houser, *drying oven* Jisico, satu set alat Kromatografi Cair Vakum (KCV), satu set alat Kromatografi Lapis Tipis (KLT), satu set alat Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG), lampu UV λ 254 nm, spektrofotometer FT-IR Shimadzu 8400, spektrofotometer ultraungu-tampak (UV-Vis) Hitachi model 150/20, dan GC-MS Shimadzu QP-2010.

3.2.2 Bahan-bahan

Bahan baku yang diperlukan dalam penelitian ini yakni sampel bagian kayu akar tumbuhan Datuan (*Ficus Vasculosa* Wall. Ex Miq), hama kubis-kubisan (*Plutella xylostella*), dan daun sawi segar. Bahan-bahan kimia yang akan dipakai yaitu pelarut metanol, etil asetat, n-heksana, aseton, akuades (H₂O), larutan NaOH 10%, silika gel (Merck G-60) bubuk, silika gel Merck bubuk kasar (230-400 mesh), silika merck 60 GF₂₅₄ (63-200 μ m) pereaksi Dragendorf, Lieberman Buchard (anhidrida asetat : asam sulfat pekat, 1:1), dan pereaksi serum sulfat.

3.3 Tahapan Penelitian

3.3.1 Pengambilan dan persiapan sampel

Sampel berupa kayu dan kulit akarnya dalam keadaan basah dari tumbuhan Datuan didapat di Desa Batu Nangkop, Kecamatan Sungkai Utara, Kotabumi, Kabupaten Lampung Utara, Lampung, Indonesia. Sebelumnya, tumbuhan akar wangi sebagai bahan baku dideterminasi di Herbarium Bogoriensis bidang Botani Pusat Penelitian Biologi LIPI Bogor. Sampel tersebut dibersihkan, dicacah hingga ukuran persegi tipis 1 cm, dikering anginkan di bawah matahari, dan ditimbang untuk digunakan pada tahap selanjutnya (Bahri *et al.*, 2021).

3.3.2 Proses Ekstraksi

Kayu akar tumbuhan Datuan sebanyak \pm 6 kg dalam keadaan kering digiling sampai bentuk serbuk kasar, kemudian diekstraksi menggunakan pelarut metanol sebanyak tiga kali pengulangan dimana perbandingan 1 kg sampel direndam dengan 2-3 liter pelarut. Ekstraksi dilakukan dengan metode perendaman (maserasi) selama 3-4 hari. Ekstrak kayu akar datuan disaring menggunakan corong dan kertas saring, kemudian dipekatkan menggunakan penguap putar vakum (Heidolph VV-2000) pada temperatur 40-50°C dengan laju putar 40-60 rpm dan tekanan rendah (vakum). Volume pemekatan sampel yang baik dengan penguap putar vakum dihasilkan umumnya sekitar sepertiga hingga seperlima dari bagian awal saat maserasi. Sampel yang telah dipekatkan lalu dikeringkan hingga pelarutnya menguap dan ditimbang bobotnya. Ekstrak pekat diambil sebagian untuk diuji fitokimia dan uji pendahuluan sebagai *antifeedant* terhadap hama kubis, lalu diuji KLT untuk melihat pemisahan pita senyawa yang terkandung di dalamnya (Bahri *et al.*, 2021).

3.3.3 Uji fitokimia

Ekstrak yang telah pekat dilakukan uji fitokimia pada plat porselen yang terdiri dari uji alkaloid, terpenoid, steroid, dan flavonoid. Uji alkaloid dalam sampel dilakukan menggunakan pereaksi Dragendorff yang menunjukkan hasil positif jika terbentuk endapan merah jingga. Uji terpenoid serta senyawa turunannya dapat dilakukan menggunakan pereaksi Lieberman Buchard, adanya steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru atau biru kehijauan. Sedangkan adanya terpenoid ditunjukkan oleh terbentuknya warna merah jingga atau ungu. Uji adanya flavonoid dan senyawa-senyawa fenolik dalam sampel dilakukan menggunakan pereaksi larutan NaOH 10% yang menunjukkan hasil positif bila terbentuk perubahan warna dari kuning ke orange-merah (Bahri *et al.*, 2021).

3.3.4 Fraksinasi menggunakan Kromatografi Cair Vakum (KCV)

Ekstrak pekat yang telah dikeringkan ditimbang bobotnya lalu dimurnikan menggunakan KCV. Pemilihan pelarut dimulai dengan pelarut non-polar sampai pelarut yang bersifat polar. Fase diam pada kolom vakum dipreparasi dengan cara mengalirkan n-heksana ke silika gel GF-254 yang telah dimasukkan ke dalam kolom sambil diketuk-ketuk dinding kolom agar kemasan merata serta silika gel padat (tidak ada rongga udara) dan dihisap vakum hingga semua n-heksana kering. Penggunaan pompa vakum mengakibatkan kerapatan kemasan kolom menjadi maksimum. Sampel diimpregnasi menggunakan silika gel yang agak kasar (200-400 mesh) sehingga sampel terserap ke permukaan silika. Sampel dimasukkan dalam kolom dengan posisi di atas fasa diam, kolom dapat divakum agar didapat kerapatan sampel dan fasa diam yang baik. Sampel siap dielusi dengan pelarut dimulai dari yang kepolarannya rendah lalu divakumkan, proses diulang hingga pelarut yang paling polar. Setiap proses penambahan pelarut baru, kolom lebih dulu dihisap hingga kering dari pelarut. Sampel dielusi gradien dengan n-heksan, etil asetat, aseton, dan metanol dalam perbandingan yang ditingkatkan kepolarannya secara berurutan. Fraksi-fraksi yang didapat diuji KLT dan fraksi yang memiliki nilai Rf sama digabung menjadi satu. Fraksi yang digabung diuji KLT kembali dan dapat dikolom ulang hingga didapatkan pemisahan yang baik (Bahri *et al.*, 2021).

3.3.5 Pemisahan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Fraksi-fraksi hasil kolom vakum diidentifikasi dengan KLT menggunakan variasi pelarut n-heksana, etil asetat, aseton dan metanol. Sampel diambil dengan pipet kapiler, kemudian ditotolkan pada plat KLT yang telah diberi batas tertentu. Hasil elusi disemprot pereaksi serium sulfat atau dilihat di bawah UV λ 254 nm untuk melihat pemisahan yang terjadi. Plat yang disemprot dengan pereaksi serium sulfat dapat dipanaskan untuk melihat pita yang tak tampak pada plat (Bahri *et al.*, 2021).

3.3.6 Pemurnian menggunakan Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG)

Pemurnian menggunakan kolom gravitasi adalah proses akhir apabila fraksi-fraksi kolom vakum yang telah diuji KLT menunjukkan pita senyawa dominan. Fraksi yang akan dikolom lebih dulu dikeringkan atau diimpregnasi. Preparasi kolom sama seperti kolom vakum. Pelarut untuk elusi ditentukan dari hasil pengujian KLT. Fraksi dimurnikan menggunakan KKG yang telah dimasukkan silika merk 60 GF₂₅₄ (63-200 μ m) pada kolomnya untuk mendapatkan pemisahan yang baik dan diperoleh senyawa isolat yang murni. Fraksi senyawa isolat murni kemudian direkristalisasi hingga dihasilkan kristal (Bahri *et al.*, 2021).

3.3.7 Uji Bioaktivitas

Sebelum proses fraksinasi, pemisahan, dan pemurnian, sampel ekstrak kasar dilakukan uji pendahuluan untuk mengetahui bioaktivitasnya sebagai *antifeedant*. Uji bioaktivitas sebagai *antifeedant* juga dilakukan pada sampel senyawa isolat hasil pemurnian. Pengujian *antifeedant* dilakukan terhadap hama kubis-kubisan (*Plutella xylostella*) yang telah disiapkan. Cara pengujian bioaktivitasnya yaitu dengan mengoleskan sampel tersebut pada permukaan daun sawi segar yang telah dipotong persegi 2 x 2 cm. Pada daun tersebut kemudian diletakkan 3 ekor ulat sawi. Pengamatan dilakukan dengan rentang waktu 24 jam. Permukaan daun diamati setelah pengujian berjalan 24 jam dan 48 jam dengan cara memplot lembaran daun dengan kertas milimeter blok. Untuk kontrol uji digunakan daun sawi yang telah diolesi pelarut metanol (Bahri *et al.*, 2021).

3.3.8 Karakterisasi Senyawa Isolat Murni

Sampel senyawa isolat murni dianalisis menggunakan Spektrofotometri Ultraungu-tampak (UV-Vis), *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FT-IR), dan *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) (Bahri *et al.*, 2021).

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Ekstraksi Sampel Kayu Akar Tumbuhan Datuan

Berdasarkan jumlah sampel kayu yang diambil dari tumbuhan datuan (*Ficus Vasculosa* Wall. Ex Miq) yang digunakan, sebanyak 25 liter metanol teknis digunakan untuk maserasi sampel kayu tersebut. Jumlah pelarut yang digunakan dalam satu kali maserasi untuk sampel kering 6 kilogram yakni sebanyak \pm 8 liter. Sampel yang dimaserasi didiamkan selama 3 hari dalam wadah tertutup rapat, dan proses maserasi dilakukan 3 kali pengulangan berturut-turut. Proses maserasi dilanjutkan sampai semua senyawa kimia dalam sampel terekstraksi oleh pelarut. Hasil maserasi disaring dan diperoleh sebanyak 20 liter filtrat ekstrak kasar metanol berwarna kuning kecoklatan. Ekstrak kasar tersebut dipekatan menggunakan *vacum rotary evaporator* dan didapatkan sebanyak 28 gram ekstrak pekat berwarna coklat kehitaman. Pelarut yang tersisa kemudian dibiarkan untuk diuapkan dari ekstrak pekatnya.

Sampel ekstrak pekat kering diambil sekitar 0,5 - 1 gram, yang kemudian dianalisis kandungan fitokimianya. Ekstrak diencerkan dengan sedikit pelarut dan diletakkan di plat porselen sebelum pengujian dilakukan. Pengujian fitokimia dilakukan dengan reagen Dragendorf, Liebermann Buchard, dan NaOH 10% untuk mengidentifikasi senyawa kimia pada sampel ekstrak tersebut, dilanjutkan dengan visualisasi menggunakan reagen serum sulfat berdasarkan pita warna ekstrak yang diuji pada pelat KLT menggunakan pelarut n-heksana : etil asetat (8:2). Tabel 2 menyajikan hasil uji fitokimia yang diperoleh.

Tabel 2. Hasil uji fitokimia ekstrak sampel kayu tumbuhan datuan

Pereaksi	Hasil	Uji KLT + Serum Sulfat
Dragendorf	Sedikit endapan merah	(+) alkaloid dengan pita kemerahan
Liebermann Buchard	Larutan berwarna hijau dengan anhidrida asetat dan warna ungu-hitam setelah ditambahkan H ₂ SO ₄ pekat	(+) steroid dan terpenoid dengan pita <i>overlap</i> berwarna ungu, hijau, dan biru
NaOH 10%	Larutan keruh dan terdapat endapan putih kekuningan	(+) flavonoid dengan pita kuning kecoklatan

Hasil uji fitokimia seperti yang ditampilkan pada **Tabel 2**, menunjukkan bahwa sampel ekstrak kayu dari tumbuhan datuan mengandung flavonoid melalui uji dengan reagen NaOH 10% yang menghasilkan endapan putih kekuningan, dan dibuktikan dengan warna kuning kecoklatan pada plat KLT dengan nilai Rf 0,5 hingga 0,7. Selain itu, sampel ekstrak juga positif mengandung steroid melalui uji dengan reagen Liebermann Buchard yang ditambahkan anhidrida asetat menghasilkan warna hijau tua, dan menghasilkan ungu-hitam ketika asam sulfat kuat ditambahkan, menunjukkan adanya terpenoid pada sampel tersebut. Hal tersebut dibuktikan juga melalui nilai Rf pita steroid dan terpenoid yaitu 0,7 – 0,9. Terakhir, pengujian menggunakan reagen Dragendorff menghasilkan endapan kristal merah, dan diperoleh pita berwarna kemerahan pada plat KLT, menunjukkan adanya alkaloid dengan nilai Rf 0,3 sampai 0,4. Selanjutnya, prosedur pemurnian sampel ekstrak tersebut difokuskan untuk memperoleh senyawa steroid.

4.2 Pemurnian dengan Kromatografi Kolom

Sampel kering \pm 12,5 gram diambil dan dipreparasi menggunakan silika kasar (200-400 mesh) dengan rasio berat antara sampel dan silika yaitu 1:2. Pada fase diam digunakan 25 gram silika kasar, dan silika halus 125 gram. Sesuai dengan pita pemisah komponen sampel, pelarut n-heksana, etil asetat, aseton, dan metanol dengan peningkatan kepolaran digunakan untuk mengelusi sampel di dalam kolom. Jumlah pelarut yang dibutuhkan per fraksi kolom yaitu 250 mililiter. Kromatografi kolom pertama menghasilkan 20 fraksi. Fraksi tersebut dianalisis menggunakan KLT untuk mengidentifikasi pita pemisahan yang seragam. Berdasarkan hasil analisis tersebut, diperoleh fraksi F₁, F₂ (Ba), F₃ - F₅ (Bb), F₆, F₇ (Bc), dan F₈ - F₂₀ memiliki pola pita yang sama.

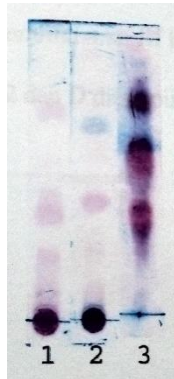
Sesuai sifat pelarutnya, Ba bersifat non-polar karena dielusi dengan pelarut non-polar (n-heksana), sedangkan Bb dan Bc bersifat semi-polar karena dielusi dengan pelarut semi-polar (n-heksana dan etil asetat), namun Bc lebih polar dari fraksi Bb. Sedangkan fraksi F₈ - F₂₀ tidak dikolom karena temuan analisis pita pemisah dari pelat KLT memiliki resolusi yang kurang memadai.

Dari hasil tersebut, fraksi Bb semi-polar dipilih karena memiliki komponen dan resolusi pita dari pemisahan senyawa yang sangat baik. Fraksi Bb dipekatkan dan diperoleh sebanyak 3,06 gram, kemudian dibagi menjadi dua bagian, dan masing-masing bagian dipisahkan dengan kromatografi kolom vakum (KKV). Hasil pemisahan tersebut diperoleh fraksi C1 sebanyak 23 buah dan fraksi C2 sebanyak 28 buah. Dari seluruh fraksi tersebut, diperoleh fraksi yang terpisah dengan baik yaitu Cb (C₁₄ - C₁₇) dan Cb2 (C₂₆ - C₂₇) sehingga dapat digabungkan. Fraksi gabungan tersebut dikolom kembali dan diperoleh fraksi D sebanyak 22 buah. Semua fraksi D tersebut dibiarkan sampai pelarutnya menguap. Dari seluruh fraksi D, didapatkan fraksi D₇ - D₁₂ yang menghasilkan kristal putih kekuningan berdasarkan uji KLT dan menunjukkan pita senyawa kimia yang hampir murni. Kemudian, fraksi D₇ - D₁₂ digabungkan kembali dan

pelarutnya diuapkan untuk pemisahan lebih lanjut menggunakan kolom gravitasi dengan pelarut n-heksana : etil asetat yang polaritasnya ditingkatkan. Hasil kolom gravitasi tersebut diperoleh fraksi E sebanyak 10 buah. Dari seluruh fraksi E, hanya fraksi E₂ - E₄ yang menghasilkan kristal putih kekuningan sehingga dapat digabungkan. Setelah dicuci dengan metanol, fraksi gabungan E₂ - E₄ diperoleh kristal putih yang larut dalam n-heksana.

4.3 Analisis melalui Uji KLT

Uji KLT digunakan untuk menentukan pemisahan komponen dalam sampel pekat sehingga perbandingan pelarut untuk kromatografi kolom dapat ditentukan. Pengujian dilakukan dengan pelarut n-heksana : etil asetat (8:2); dan n-heksana : aseton (8:2) untuk mengamati pita pemisah komponen yang bersifat non-polar dan semi-polar. **Gambar 4** menunjukkan hasil uji KLT dari ekstrak awal dan setelah kolom pertama. Banyak komponen dari nilai R_f tinggi hingga rendah terlihat pada pemisahan pita dari ekstrak awal.

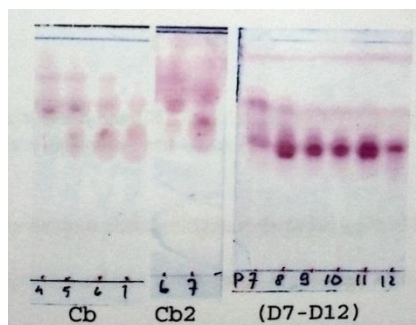


Gambar 4. Hasil uji KLT ekstrak awal (1) dengan pelarut n-heksana : aseton (8:2), dan (2) dengan pelarut n-heksana : etil asetat (8:2), serta (3) fraksi gabungan F₃ – F₅ (Bb) dengan pelarut n-heksana : etil asetat (8:2)

Hasil uji KLT dengan pelarut n-heksana : etil asetat (8:2) ditemukan beberapa pita dengan R_f = 0,38; 0,67; dan 0,88. Pada uji KLT dengan pelarut n-heksana : aseton (8:2), diperoleh pita dengan R_f = 0,44; 0,67; dan 0,88. Hal tersebut membuktikan bahwa menaikkan polaritas pelarut dalam jumlah kecil tidak berdampak pada resolusi pemisahan. Menggunakan perbandingan pelarut polar yang lebih tinggi, seperti aseton, aseton - metanol, menghasilkan pita pemisahan yang lemah karena komponen sampel seluruhnya terbawa oleh pelarut. Hasil uji KLT dari penggabungan fraksi kolom pertama yaitu F₃ - F₅ (Bb) dengan pelarut n-heksana : etil asetat (8:2) didapatkan pita pada R_f = 0,33; 0,55; dan 0,70.

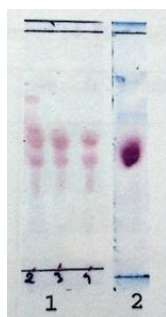
Kromatografi kolom vakum yang kedua berfokus pada penghilangan komponen dengan nilai R_f yang rendah (polar), sehingga pemurnian komponen terbatas hanya pada senyawa non-polar dan semi-polar. Hasil kolom tersebut diperoleh 2 fraksi gabungan yakni C_b dan C_{b2} karena dapat terpisah dengan baik. Selanjutnya, fraksi gabungan tersebut dikolom kembali dan diperoleh 6

buah fraksi (D₇ - D₁₂) dengan nilai R_f sekitar 0,55. **Gambar 5** menampilkan hasil uji KLT yang dilakukan pada fraksi Cb, Cb2, dan D.



Gambar 5. Kromatogram hasil uji KLT dari fraksi gabungan Cb, Cb2, dan D.

Hasil pemurnian menggunakan kromatografi kolom gravitasi diperoleh fraksi E₂-E₄, yang pola pemisahannya hampir identik dengan fraksi D. Meskipun hasil uji KLT terhadap fraksi E₂-E₄ menunjukkan bahwa senyawa tersebut belum murni, tetapi pada fraksi tersebut menunjukkan hasil kristal putih kekuningan yang tidak larut. Setelah kristal tersebut dicuci dengan metanol, diperoleh kristal berwarna putih yang larut. Selain itu, isolat kristal tersebut dielusikan dalam pelarut n-heksana, dan diperoleh sebanyak 10 mg kristal putih amorf. Selanjutnya, isolat drystal juga dielusikan dengan pelarut n-heksana : etil asetat (8:2), dan diperoleh pita tunggal dengan R_f = 0,5. Dengan pelarut n-heksana : aseton (8:2), hasil elusi kristal diperoleh pita tunggal dengan R_f = 0,5. Dengan pelarut etil asetat : aseton (8:2), hasil elusi kristal diperoleh juga pita tunggal dengan R_f = 0,9. **Gambar 6** menampilkan hasil uji KLT terhadap kristal tersebut.









Gambar 6. Hasil uji KLT terhadap (1) fraksi E₂-E₄; dan (2) isolat kristal dengan pelarut n-heksana : etil asetat (8:2)

Selain uji kemurnian dengan perbandingan pelarut, isolat kristal juga dilakukan uji titik leleh, di mana diperoleh titik leleh dari isolat kristal tersebut sebesar 145 – 150 °C. Hasil uji kemurnian dan titik leleh tersebut digunakan sebagai parameter pengukuran spektroskopi untuk keperluan elusidasi struktur.

4.4 Pengujian Bioaktivitas terhadap Ekstrak Kasar dan Isolat Kristal

Sampel yang diuji bioaktivitasnya terhadap *Plutella xylostella*, terdiri dari ekstrak kasar pekat, dan isolat kristal murni dengan kontrolnya menggunakan pelarut metanol. Daun sawi dipotong berukuran 2x2 cm dan ekstrak kasar tersebut dioleskan ke permukaannya. Hal yang sama

dilakukan pada isolat kristal maupun pada metanol sebagai kontrol. Untuk menjaga aliran udara, pengujian dilakukan dalam cawan petri yang dilapisi plastik berlubang. Pengamatan dilakukan 24 dan 48 jam dengan hasil seperti yang ditunjukkan pada **Gambar 7**.

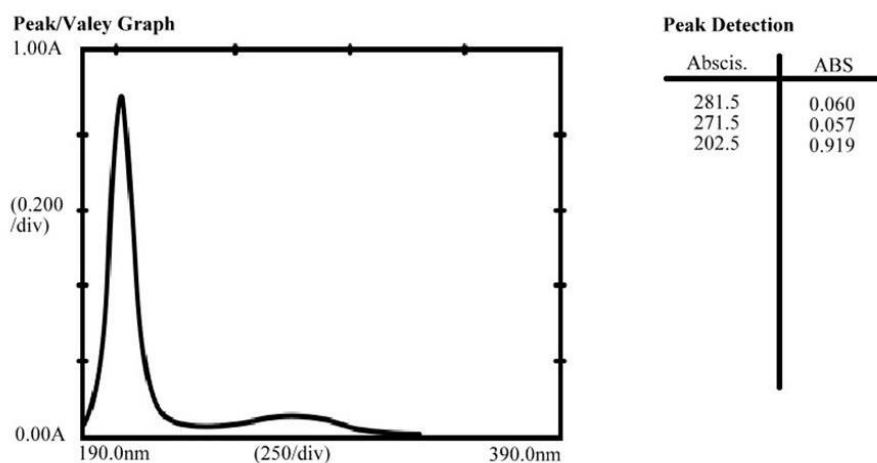
	Setelah 24 Jam	Setelah 48 Jam
Kontrol MeOH		
Ekstrak		
Murni		

Gambar 7. Hasil uji bioaktivitas terhadap *Plutella xylostella*

Hasil uji bioaktivitas diperoleh bahwa pola kerusakan daun yang disebabkan oleh *Plutella xylostella* pada 24 dan 48 jam dengan metanol sebagai kontrol lebih dominan dibandingkan dengan ekstrak kasar maupun isolat kristal murni. Hal ini terlihat pada daun yang dioleskan dengan sampel ekstrak kasar dan isolat kristal murni, setelah 24 jam terdapat 2 dari 3 ulat yang masih hidup, sementara 1 ulat telah mati. Setelah 48 jam pengamatan, salah satu dari 2 ulat yang masih hidup tersebut menjadi kepompong, sementara yang lainnya mati. Selain itu, terdapat perbedaan tingkat kerusakan daun yang telah diberikan sampel ekstrak kasar dan isolat kristal murni, di mana tingkat kerusakan daun dengan pemberian sampel ekstrak kasar sedikit lebih kecil dibandingkan tingkat kerusakan daun dengan pemberian sampel isolat kristal murni. Hal ini terjadi karena masih terdapat komposisi senyawa campuran dalam ekstrak kasar tersebut yang belum teridentifikasi, sedangkan pada sampel isolat kristal murni teridentifikasi golongan senyawa steroid non-polar. Dengan demikian, baik ekstrak kasar maupun kristal murni yang diisolasi dari akar tumbuhan datuan memiliki bioaktivitas terhadap *Plutella xylostella*.

4.5 Analisis menggunakan Spektrofotometer UV

Hasil analisis sampel dengan konsentrasi 100 ppm menggunakan spektrofotometer UV pada rentang panjang gelombang 190 – 390 nm berbasis pelarut n-heksana ditunjukkan pada **Gambar 8**. Pelarut n-heksana digunakan karena tidak menyerap pada panjang gelombang UV dan juga didasarkan pada sifat sampel tersebut yang non-polar.



Gambar 8. Hasil analisis menggunakan spektrofotometer UV

Spektrum UV yang diperoleh memiliki pita pada panjang gelombang 202,5 nm dengan absorbansi (A) yakni 0,919; pada 271,5 nm dengan $A = 0,057$; dan pada 281,5 nm dengan $A = 0,060$. Sampel mempunyai gugus Absorbansi dapat digunakan untuk menghitung absorptivitas molar (ϵ), yang ditunjukkan pada **Tabel 3**. Berdasarkan spektrum UV tersebut, penyerapan maksimum terjadi pada panjang gelombang pendek yakni 202,5 nm, sehingga diperkirakan senyawa yang dianalisis tidak memiliki gugus kromofor ikatan $C=C$ terkonjugasi. Namun, senyawa ini diduga memiliki gugus auksokrom atau gugus fungsi dengan elektron non-ikatan, seperti gugus hidroksil. Gugus auksokrom ini menyerap sinar ultraviolet jauh (sekitar 100 hingga 190 nm), sehingga menyebabkan transisi $n \rightarrow \pi^*$. Kromofor yang mengikat auksokrom dapat menyebabkan pergeseran serapan panjang gelombang (Suhartati, 2017). Melalui referensi lain bahwa data spektrum UV ini belum dapat ditemukan pembandingan data spektrum standarnya, sehingga untuk mengidentifikasi senyawa ini perlu dilakukan analisis lebih lanjut seperti menggunakan IR dan MS.

Tabel 3. Perhitungan absorpsivitas molar (ϵ)

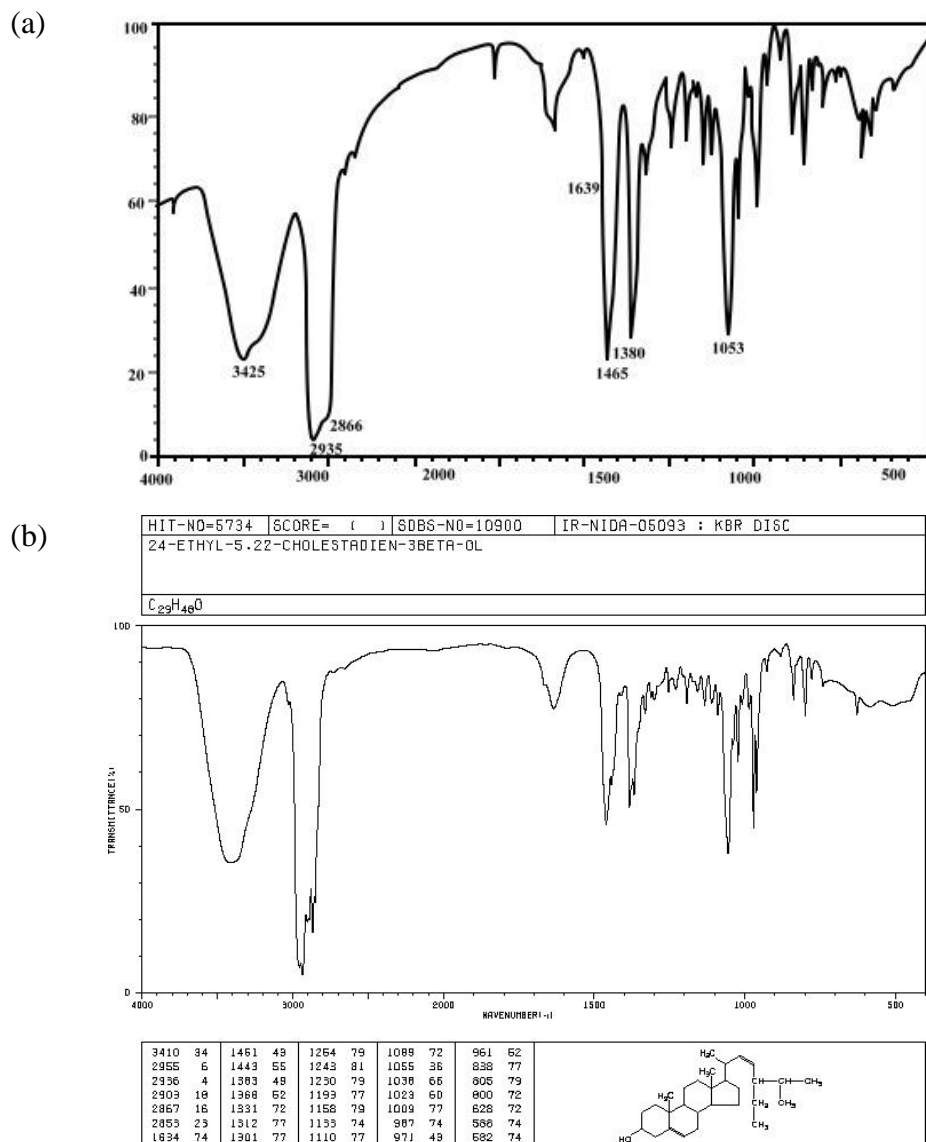
Panjang gelombang (λ)	Absorbansi (A)	Absorpsivitas molar (ϵ)
		(log ϵ)
202,5 nm	0,919	4,5803
271,5 nm	0,057	3,3729
281,5 nm	0,060	3,3952

Keterangan :

Massa senyawa hasil isolasi	= 10 mg, digunakan 0,1 mg = 0,0001g
BM β -sitosterol ($C_{29}H_{50}O$)	= 414 gr/mol
Volume pelarut (<i>n</i> -heksana)	= 10 mL = 0,01 L
Tebal sel (kuvet)	= 1cm

4.6 Analisis menggunakan Spektroskopi IR

Hasil analisis sampel isolat kristal menggunakan spektroskopi IR diperoleh spektrum seperti yang ditampilkan pada **Gambar 9**.

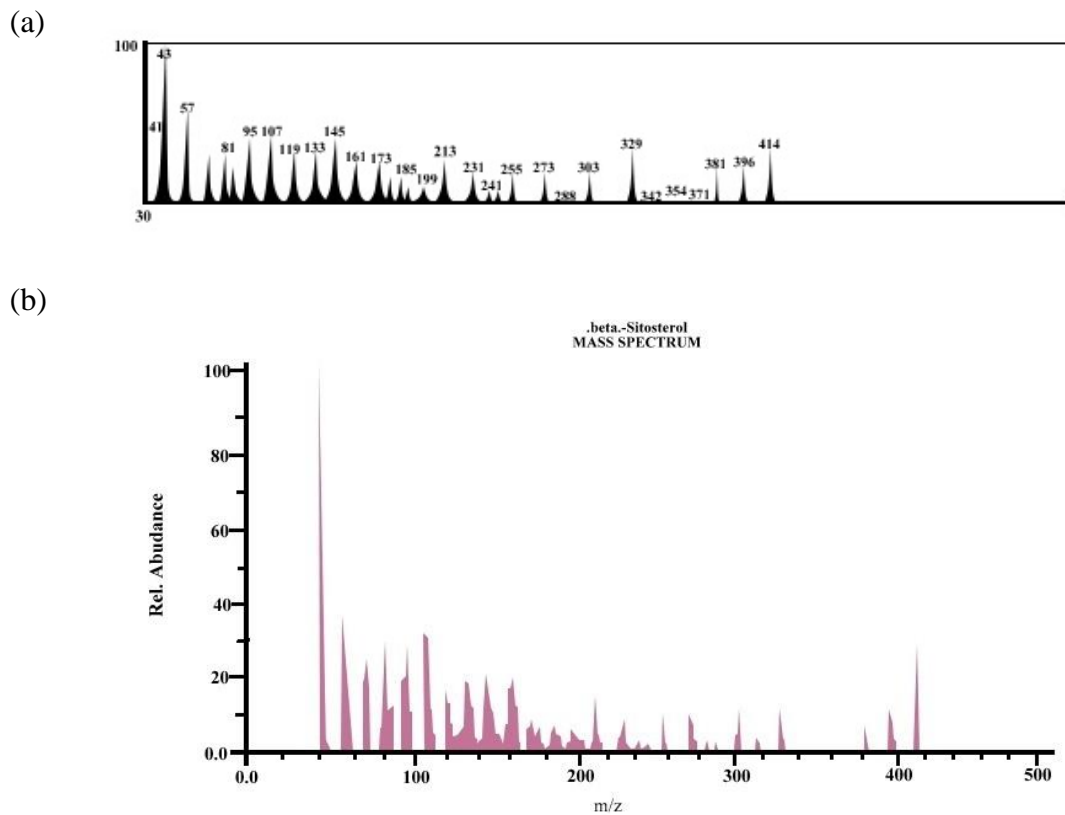


Gambar 9. Spektrum IR (a) hasil analisis sampel isolat kristal, dan (b) data pembandingan standar (Azeez *et al.*, 2018)

Hasil spektrum IR dari isolat kristal tersebut diperoleh serapan pada bilangan gelombang 3425 cm^{-1} , yang mengindikasikan adanya vibrasi uluran gugus fungsi O-H. Serapan pada bilangan gelombang 2935 cm^{-1} dan 2866 cm^{-1} masing-masing berasal dari vibrasi uluran C-H sp^3 dan C-H sp^2 . Pada bilangan gelombang 1639 cm^{-1} muncul mengindikasikan adanya serapan lemah dari vibrasi uluran C=C non-konjugasi. Serapan pada bilangan gelombang 1465 cm^{-1} dan 1380 cm^{-1} berasal dari vibrasi tekukan C-H sp^3 pada gugus fungsi isopropil. Sedangkan pada bilangan gelombang 1053 cm^{-1} muncul serapan khas vibrasi tekukan O-H (2°) yang berasal dari β -sitosterol. Hasil tersebut selaras dengan data pembandingan standar spektrum IR yang dilaporkan oleh Azeez *et al.*, (2018). Namun, untuk memvalidasi lebih detail bahwa senyawa isolat kristal ini berasal dari β -sitosterol, maka dilakukan juga melalui analisis MS.

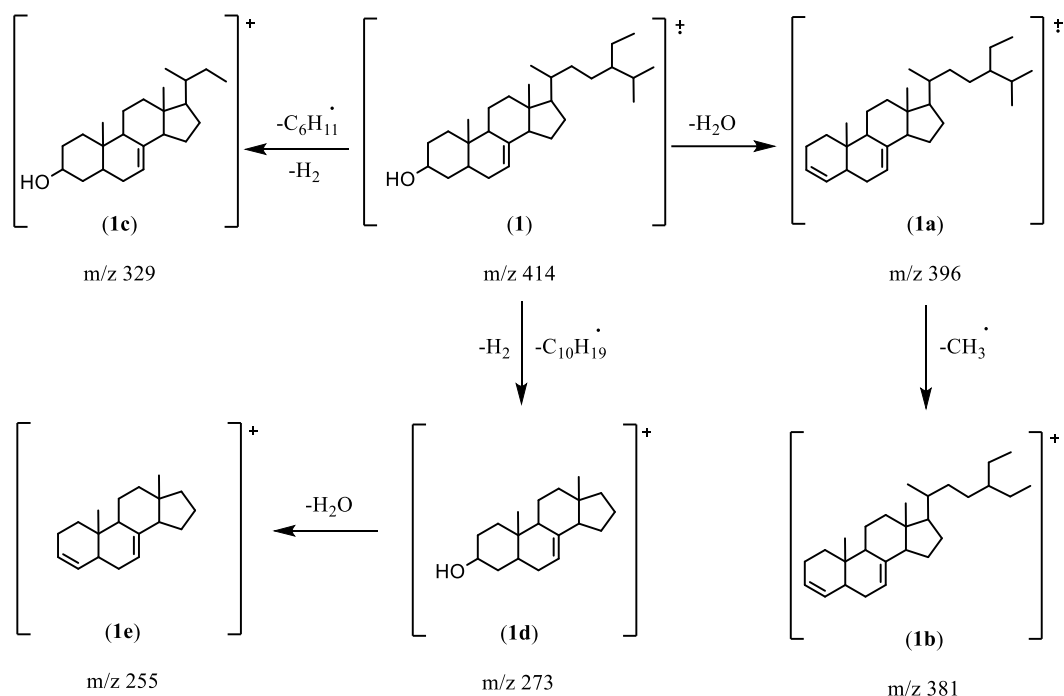
4.7 Analisis menggunakan Spektroskopi Massa (MS)

Hasil analisis sampel isolat kristal menggunakan spektroskopi massa diperoleh spektrum MS seperti yang ditunjukkan pada **Gambar 10**.



Gambar 10. Spektrum MS (a) hasil analisis sampel isolat kristal, dan (b) data pembandingan standar (Azeez *et al.*, 2018)

Spektrum MS tersebut menampilkan pola fragmentasi m/z dengan M^+ yaitu 414 dengan puncak dasar terdeteksi pada $m/z = 43$. dan 201 (100) sebagai puncak dasar. Puncak fragmentasi (m/z) yang lain muncul pada 396, 381, 329, 273, dan 255. Pola fragmentasi tersebut (**Gambar 11**) dapat diamati bahwa senyawa (**1**) dengan $M^+ = 414$ mengindikasikan melepaskan molekul H_2O menghasilkan senyawa (**1a**) dengan $m/z = 396$. Fragmentasi selanjutnya berturut-turut dari senyawa (**1a**) didapatkan senyawa (**1b**) dengan $m/z = 281$ melalui pelepasan radikal CH_3 . Selain itu, fragmentasi dari senyawa (**1**) juga diperoleh senyawa (**1c**) dengan $m/z = 329$ melalui pelepasan radikal C_6H_{11} dan molekul H_2 , dan didapatkan senyawa (**1d**) dengan $m/z = 273$ melalui pelepasan radikal $C_{10}H_{19}$ dan molekul H_2 yang dilanjutkan dengan pelepasan molekul H_2O dan diperoleh senyawa (**1e**) dengan $m/z = 255$. Apabila pola fragmentasi MS hasil analisis sampel isolat kristal dibandingkan dengan data spektrum MS standar yang dilaporkan oleh Azeez *et al.*, (2018), maka terlihat jelas bahwa pola fragmentasi tersebut identik.



Gambar 11. Pola fragmentasi senyawa β -sitosterol

Berdasarkan $M^+ = 414$ yang diperoleh membuktikan bahwa senyawa isolat kristal ini mempunyai $M_r = 414$ g/mol (genap). Sesuai aturan nitrogen, senyawa dengan bobot molekul genap hanya atom C, H, dan O. Apabila mengandung atom N, maka harus berjumlah genap (Suhartati, 2017), tetapi berdasarkan hasil spektrum IR tidak mengandung nitrogen. Dengan demikian, prediksi rumus molekul yang didapatkan yaitu $C_{29}H_{50}O$.

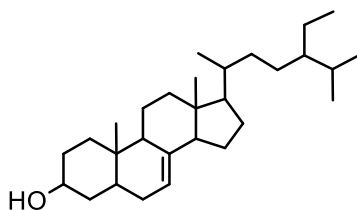
Untuk menentukan bentuk struktur senyawa isolat kristal dengan rumus molekul tersebut, maka ditentukan indeks derajat ketidakejenuhan atau *double bond equivalents* (DBE) dengan rumus berikut:

$$\text{Indeks DBE} = \text{Jumlah atom C} - \frac{\text{Jumlah atom H}}{2} + 1$$

$$\text{Indeks DBE} = 29 - \frac{50}{2} + 1$$

$$\text{Indeks DBE} = 29 - 25 + 1 = 5$$

Indeks DBE diperoleh 5 yang diartikan bahwa terdapat 4 struktur siklik dan 1 ikatan rangkap dua. Hasil perhitungan tersebut sesuai yang dijelaskan oleh [Suhartati \(2017\)](#). Dengan demikian, bahwa struktur isolat kristal tersebut terkonfirmasi sesuai dengan struktur β -sitosterol.



Gambar 12. Struktur ($3\beta, 5\alpha, 24R$) stigmasta-7-en-3-ol atau β -sitosterol

Berdasarkan elusidasi struktur tersebut, isolat kristal murni yang diisolasi dari tumbuhan datuan diperoleh berwarna putih dengan titik leleh 145 – 150 °C. Selain itu, penentuan struktur dibuktikan melalui serapan UV pada panjang gelombang maksimum 202,5 nm yang terindikasi adanya gugus fungsi O-H. Gugus fungsi O-H (2°) tersebut terkonfirmasi juga melalui IR pada bilangan gelombang 3425 cm⁻¹ dan secara khas pada 1053 cm⁻¹ yang berasal dari β-sitosterol. Bobot molekul (M⁺) melalui hasil MS diperoleh 414 g/mol yang pola fragmentasinya telah sesuai dengan struktur β-sitosterol dan didapatkan indeks DBE = 5, yang diartikan memiliki 4 struktur siklik dan 1 ikatan rangkap dua. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa senyawa yang diperoleh adalah (3β, 5α, 24R) stigmasta-7-en-3-ol atau β-sitosterol seperti yang ditunjukkan pada **Gambar 12**.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Sebagai kesimpulan, kami telah berhasil mengisolasi senyawa (3β , 5α , $24R$) stigmasta-7-en-3-ol atau β -sitosterol (steroid) dari ekstrak akar tumbuhan datuan (*Ficus vasculosa* Wall. ex Miq). Senyawa tersebut diperoleh berupa kristal berwarna putih dengan titik leleh $145 - 150$ °C. Selain itu, hasil uji senyawa tersebut menunjukkan bioaktivitas sebagai *antifeedant* terhadap hama kubis-kubisan (*Plutella xylostella*) dengan efektivitas 2 dari 3 ulat yang masih hidup, sementara 1 ulat telah mati pada pengamatan 24 jam. Sedangkan pada pengamatan 48 jam, salah satu dari 2 ulat yang masih hidup tersebut menjadi kepompong, sementara yang lainnya mati. Dengan demikian, senyawa tersebut memiliki potensi untuk dimanfaatkan sebagai *antifeedant*.

5.2 Saran

Penelitian dengan memanfaatkan potensi tumbuhan datuan (*Ficus vasculosa* Wall. ex Miq) khususnya yang ada di Provinsi Lampung masih sangat terbatas. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut secara masif guna mengeksplorasi potensi kandungan senyawa bioaktif lainnya yang dapat dimanfaatkan untuk berbagai kegunaan baik sebagai biopestisida, obat-obatan, maupun bioaktivitas lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Arbi, T. A., Afrina, A., & Guntara, D. J. (2021). Konsentrasi Hambat dan Bunuh Minimum Formula Hidrogel Ekstrak Daun Tin (*Ficus carica*) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. *Cakradonya Dental Journal*, 13(1), 22-31.
- Aritan, J., Mongi, J., Untu, S., & Pareta, D. (2019). Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Tagalolo *Ficus septica* Burm F Terhadap Larva *Artemia salina* Leach dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). *Biofarmasetikal Tropis*, 2(1), 85-90.
- Azeez, R. A., Abaas, I. S., & Kadhim, E. J. (2018). Isolation and Characterization of β -sitosterol from *Elaeagnus angustifolia* cultivated in Iraq. *Asian J Pharm Clin Res*, 11(11), 442-446.
- Bahri, S., Ambarwati, Y., & Marlina, L. (2020). Identification of Phenyl Propanoid Compound Isolated from Root Bark Datuan (*Ficus vasculosa* Wall. Ex Miq) and Antibacterial Activity Test on *Escherichia coli*. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 537(1), 012-046.
- Bahri, S., Ambarwati, Y., Marlina, L., Hadi, S., & Fitriani, V. 2021. The Attractant Bioactivity Test of Semi-Polar Fraction of the Datuan Stem Bark (*Ficus vasculosa* Wall. Ex Miq) against Warehouse Pest (*Sitophilus oryzae* L.). *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 7004(2021), 1-11.
- Bertoletti, L. L., Skoronski, E., Schittler, L., & Kempka, A. P. (2018). Extracts of Leaves of *Ficus auriculata* Lour.: antioxidant, antimicrobial and phytotoxic activity. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 83(4), 321-328.
- Chawla, A., Kaur, R., & Sharma, A. K. (2012). *Ficus carica* Linn. : A Review on its Pharmacognostic, Phytochemical and Pharmacological Aspects. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*, 1(4), 215–232.
- Chen, L. W., Cheng, M. J., Peng, C. F., & Chen, I. S. (2010). Secondary metabolites and antimycobacterial activities from the roots of *Ficus nervosa*. *Chemistry and Biodiversity*, 7(7), 1814–1821.

- Damayanti, S., Khonsa, K., & Amelia, T. (2021). Antiviral activity and toxicity prediction of compounds contained in figs (*Ficus carica* L.) by in silico method. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 8(1), 21-33.
- Gargiullo, M. B. (2005). Invasive Plants of Asian Origin Established in the United States and Their Natural Enemies. *The Journal of the Torrey Botanical Society*, 132(2), 79–84.
- Hendrayana, Y., Widodo, P., Kusmana, C., & Widhiono, I. (2019). Diversity and distribution of figs (*Ficus* spp.) across altitudes in gunung tilu, Kuningan, West Java, Indonesia. *Biodiversitas*, 20(6), 1568–1574.
- Huang, N. C., Hung, W. T., Tsai, W. L., Lai, F. Y., Lin, Y. S., Huang, M. S., Chen, J. J., Lin, W. Y., Weng, J. R., & Chang, T. H. (2017). *Ficus septica* plant extracts for treating Dengue virus in vitro. *PeerJ*, 5, e3448. Doi : 10.7717/peerj.3448
- Kubo, M., Yatsuzuka, W., Matsushima, S., Harada, K., Inoue, Y., Miyamoto, H., Matsumoto, M., & Fukuyama, Y. (2016). Antimalarial phenanthroindolizine alkaloids from *Ficus septica*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 64(7), 957-960.
- Li, J. J., Mo, L., & Song, J. L. (2019). Improvement effect of *ficus vasculosa* ethanol extract on d-galactose-induced mice aging. *Natural Product Communications*, 14(12), doi: 1934578X19896676.
- Li, Z., Yang, Y., Liu, M., Zhang, C., Shao, J., Hou, X., Tian, J. & Cui, Q. (2021). A comprehensive review on phytochemistry, bioactivities, toxicity studies, and clinical studies on *Ficus carica* Linn. leaves. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 137(2021), 111-393.
- Mawa, S., Husain, K., & Jantan, I. (2013). *Ficus carica* L. (Moraceae): Phytochemistry, traditional uses and biological activities. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2013. doi: 10.1155/2013/974256.
- Putra, K. W. E., Pitoyo, A., Nugroho, G. D., Rai, M., & Setyawan, A. D. (2020). Phytochemical

activities of *Ficus* (Moraceae) in Java Island, Indonesia, *International Journal of Bonorowo Wetlands*, 10(2),

Qian-wei, W. E. I., Xue-li, C. H. E. N., Yi-yan, Z. H. A. O., Yu-hua, G. U., Han-hong, X. U., & Jing-jing, L. I. (2016). Bioactivities and Chemical Constituents of *Ficus vasculosa* Leaves Extracts. *Natural Product Research And Development*, 28(7), 10-55.

Sandabe, U. K., Onyeyili, P. A. and Chibuzo, G. A. (2006). Phytochemical screening and effect of aqueous extract of *Ficus sycomorus* L. (Moraceae) stembark on muscular activity in laboratory animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 103(3), 481–483.

Shi, Y. X., Xu, Y. K., Hu, H. B., Na, Z., & Wang, W. H. (2011). Preliminary assessment of antioxidant activity of young edible leaves of seven *Ficus* species in the ethnic diet in Xishuangbanna, Southwest China. *Food Chemistry*, 128 (4), 889–894.

Slatnar, A., Klancar, U., Stampar, F., and Robert Veberic. (2011). Effect of drying of figs (*Ficus carica* L.) on the contents of sugars, organic acids, and phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(21), 11696–11702.

Suhartati, T. (2017). *Dasar-dasar spektrofotometri UV-Vis dan spektrometri massa untuk penentuan struktur senyawa organik*. Aura. Bandar Lampung.

Van Noort, S., Gardiner, A. J., & Tolley, K. A. (2007). New records of *Ficus* (Moraceae) species emphasize the conservation significance of inselbergs in Mozambique. *South African Journal of Botany*, 73(4), 642–649.

Yusuf, R. (2011). Sebaran ekologi dan keanekaragaman *Ficus* spp. *Berkala Penelitian Hayati Edisi Khusus*, 5A(2011), 83–91.

Type of Manuscript:
Research

Isolation of Steroid Compounds from Datuan Root Wood Extract (*Ficus Vasculosa* Wall. ex Miq) and Bioactivity Test against Cabbage Pest (*Plutella xylostella*)

Syaiful Bahri *, Yuli Ambarwati, Endah Setyaningrum, Sutopo Hadi, Ary Rahman Hidayat, and Ganjar Andhulangi

Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Lampung, Bandar Lampung, Indonesia.

*Corresponding author:
Department of Chemistry,
Faculty of Mathematics and Natural Sciences,
Universitas Lampung, Bandar Lampung, Indonesia.
E-mail address: syaiful.bahri@fmipa.unila.ac.id
Tel: + 6285722985141.

ABSTRACT:

Natural compounds isolated from Datuan plants (*Ficus Vasculosa* Wall. Ex Miq) have piqued the attention of researchers to explore further due to the existence of unique relationship between chemical components and their bioactivity. The objective of this research was to isolate steroid compounds from the root wood extract of the Datuan plant and test their bioactivity as an antifeedant against cabbage pests (*Plutella xylostella*). The root wood samples of these Datuan plants were prepared for maceration with methanol solvent, then analyzed for the phytochemical content of the crude extract, and followed by fractionation by vacuum liquid chromatography (VLC), separation by thin layer chromatography (TLC), and purification by gravity column chromatography (GCC) to obtain the pure isolate compound. The crude extract (preliminary test) and the pure isolate compound were tested against cabbage pests to determine their bioactivity. Based on phytochemical testing, the isolated compound derived from the non-polar fraction of crude extract was categorized as a steroid with a dark green color, $R_f = 0.5$ in n-hexane : acetone (8:2), and $R_f = 0.9$ in ethyl acetate : acetone (8:2). The isolated compound was obtained as 10 mg of white crystals with a melting point between 145 - 150 °C. In addition, the isolated compound exhibits UV absorption with a maximum wavelength at absorbance (A) of 202.5 nm at $A = 0.919$; followed by wavelengths of 271.5 nm at $A = 0.057$; and 281.5 nm at $A = 0.060$, respectively. It was indicated that the absorbance at that wavelength originated from the hydroxyl (O-H) auxochrome on the chromophore, which triggered the electron excitation of $n \rightarrow \pi^*$. The presence of the O-H group was also indicated by the IR absorption at wave numbers 3425 cm^{-1} and 1053 cm^{-1} (typically derived from β -sitosterol), which is further supported by the absorption of other functional groups such as C-H sp^3 (2935 cm^{-1}), C-H sp^2 (2866 cm^{-1}), non-conjugated C=C (1639 cm^{-1}), and C-H sp^3 of isopropyl (1465 cm^{-1} and 1380 cm^{-1}). The findings of MS analysis revealed that the compound has a molecular weight of m/z (M^+) = 414 a and posses formula of $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2$ with a DBE value of 5, indicating the presence of 4 cyclic structures and 1 non-conjugated double bond. Based on these investigation, this isolated compound was classified as (3 β ,5 α ,24R)-stigmast-7-en-3-ol or β -sitosterol, which possesses bioactivity as an

antifeedant against cabbage pests with parameters observation at 24 hours (2 caterpillars were still living and 1 had perished) and 48 hours (1 caterpillar died and 1 cocooned). Therefore, it may be inferred that the compound isolated from the root wood of Datuan plants has bioactivity against these cabbage pests and posses to develop further as an antifeedant.

KEYWORDS: Steroids, Root Wood, Datuan (*Ficus Vasculosa* Wall. Ex Miq), Cabbage Pests (*Plutella xylostella*), Antifeedant.

INTRODUCTION

Exploration of bioactive compounds derived from natural materials has garnered substantial attention from researchers due to the presence of a unique relationship between chemical compounds and their bioactivity^{1,2,3}. For instance, exploration of plant part of the Datuan plant (*Ficus Vasculosa* Wall. Ex Miq) such as fruit, wood, bark, roots, and leaves have been used as traditional medicines⁴, antioxidants⁵, biopesticides^{6,7,8}, and so on.

In Indonesia, this plant belongs to the *Ficus* genus and *Moraceae* family known as Datuan (North Lampung, Indonesia). In other languages, it is known as Burut, Huru Awis, Ki Kopeng, Ki Kuya (Sunda), fig (English), ara (Malaysia), and other names⁹. More than 500 *Ficus* species have been discovered with the greatest diversity found in Sumatra (102 species), Kalimantan (106 species), Papua (99 species), Sulawesi (83 species), Java (75 species), Maluku (71 species), and Nusa Tenggara (36 species). As seen in **Figure 1**, Datuan plants are huge woody trees that grow from 30 to 50 meters tall with 90 to 110 centimeters in diameter¹⁰.

So far, various bioactive compounds isolated from Datuan (*Ficus*) plant parts have been identified. The dried seeds of the Datuan fruit contain various fatty acid compounds such as oleic acid, linoleic acid, linolenic acid, palmitic acid, stearic acid, and arachidic acid. The leaves of the Datuan plant contain several chemical compounds, including bergapten, 4',5'-dihydropsoralen, rutin, 24-methylenecycloartanol umbelliferon, marmachin, stigmasterol, β -sitosterol, ficusogenin, lupeol, and psoralen ψ -taraxasterol ester. The Datuan plant sap includes sundry biochemical compounds such as 6-O-linoleil- β -D-glucosyl- β -sitosterol, 6-O-Oleil- β -D-glucosyl- β -sitosterol, 6-O-palmitoyl- β -D-glucosyl- β -sitosterol, resin, serine, albumin, sugar, malic acid, renin, proteolytic enzymes, and lipase enzymes. The Datuan fruit contains cyanidin-3-O-glucoside, cyanidin-3-Orhamnoglucoside, saturated fat, cholesterol, sodium, calcium, protein, vitamin A, and vitamin C. Compounds of psoralen and bergapten were discovered from the roots of Datuan². The Datuan plant's bark contains several phytochemical compounds, including reducing sugars, tannins, saponins, alkaloids, and flavone aglycones¹. In addition, Putra et al.¹¹ also reviewed approximately 40 species of Datuan plants found in Java that contain bioactive compounds including alkaloids, phenols, flavonoids, tannins, saponins, terpenoids, steroids, glycosides, anthocyanins, etc. and have various bioactivity such as antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory, cytotoxic activity, analgesic activity, antidiabetic, and hepatoprotective. Mawa et al.³ reported that the bioactive compound from the Datuan plant has bioactivity as antioxidant, anticancer, hepatoprotective, hypoglycemic, hypolipidemic, antibacterial, antipyretic, antituberculosis, potentially irritating, anthelmintic, antimutagenic, and anti-HSV. However, this review was only restricted to pharmacology-related reports.

Previously, Bahri et al.¹² successfully isolated phenyl propanoic compounds from the root bark of the Datuan plant. However, when tested as an antibacterial against *Escherichia coli*, the compound was ineffective in inhibiting the growth of the bacteria (inhibition zone < 10 mm). In addition, Bahri et al.¹³ also revealed that a steroid compound isolated from the bark of the Datuan plant presented bioactivity as an attractant against warehouse pests (*Sitophilus oryzae* L.) with an attractive percentage of 71.67% and an attractive index (AI) of 0.63 so that categorized as attractants. However, the investigation was only focused on the Datuan plant's bark. Therefore, further research is necessary to identify other bioactive compounds and their bioactivities.

Hence, we were interested to extract a steroid compound from the root wood of the Datuan plant to test their bioactivity as an antifeedant against cabbage pests (*Plutella xylostella*).

MATERIALS AND METHODS

Materials

This research required samples of Datuan plant root wood (*Ficus Vasculosa* Wall. Ex Miq), cabbage pests (*Plutella xylostella*), and fresh cabbage leaves. The substances with technical and pro analytical grade reagents used were methanol, ethyl acetate, n-hexane, acetone, distilled water (H₂O), 10% NaOH solution, silica gel (Merck G-60) powder, silica gel Merck (Merck 230-400 mesh) powder, silica gel Merck 60 GF₂₅₄ (63-200 μm), Dragendorff reagent, Lieberman Buchard reagent, and cerium sulfate reagent.

Collection and Preparation of Samples

Samples of Datuan plants in the form of wet wood and root bark were collected in Batu Nangkop Village, North Sungkai District, Kotabumi, North Lampung Regency, Lampung, Indonesia. Previously, the Datuan plant samples as materials were determined at the Herbarium Bogoriensis in the Botanical field of the LIPI Research Center for Biology in Bogor. The materials were cleaned, diced into about 1 cm, air-dried in the sun, and weighed in preparation for further step¹³.

Extraction Process

The root wood of a Datuan plant weighing 6 kg in a dry condition was crushed into a coarse powder and then extracted three times with methanol solvent at a ratio of 1-kg sample to 2-3 L solvent. Three to four days of maceration are carried out for the extraction process. The Datuan root wood extract was filtered using a funnel and filter paper before being concentrated in a vacuum rotary evaporator (Heidolph VV-2000) at 40-50 °C with a rotary of 40-60 rpm, and low pressure (vacuum). The sample extract was then dried until the solvent evaporates, and its weight was determined. A portion of the concentrated extract was obtained for phytochemical testing and preliminary tests as an antifeedant against cabbage pests, and TLC was used to determine the separation of the chemical constituents in the crude extract¹³.

Phytochemical Assay

Phytochemical assay was performed on the crude extract sample to identify alkaloids, terpenoids, steroids, and flavonoids. The sample was examined for alkaloids using Dragendorff's reagent, which produced positive findings if an orange-red precipitate appeared. Assays for terpenoids and their derivatives may be conducted using Lieberman Buchard reagents, in which the appearance of a red-orange or purple color indicates the presence of terpenoids. While a blue or greenish-blue color indicates the presence of steroids. The existence of flavonoids and phenolic compounds in the sample was determined using a 10% NaOH solution reagent that produced positive findings when a color shift from yellow to orange-red occurred¹³.

Fractionation using Vacuum Liquid Chromatography (VLC)

The crude extract sample was weighed before purification using VLC. Non-polar solvents are selected first, followed by polar solvents. The stationary phase in the vacuum column was prepared by pouring n-hexane over silica gel GF₂₅₄ that had been introduced into the column while tapping on the column wall so that the stationary phase in the column was equally distributed and the silica gel was solid (no air spaces) and sucked with vacuum until all n-hexane was dry. The sample was impregnated with slightly coarse silica gel (200-400 mesh) until adsorbed to the silica surface. The sample was positioned above the stationary phase in a column, which may then be vacuumed to acquire a proper sample density and stationary phase. The sample prepared was eluted with non-polar solvents, followed by vacuuming, and this procedure was repeated until the polar solvents were used. The samples were eluted with increasing polarity ratios of n-hexane, ethyl acetate, acetone, and methanol along a

gradient. Each time a new solvent was added, the column was first sucked dry of the previous solvent. The fractions obtained were tested by TLC, and those with identical R_f values were merged¹³. The merged fractions were retested by TLC and re-columned until an appropriate separation was achieved.

Separation using Thin-Layer Chromatography (TLC)

Using a range of solvents for elution, such as n-hexane, ethyl acetate, acetone, and methanol, the vacuum column yield fractions were identified by TLC. The sample was taken out using a capillary pipette, which was subsequently spotted on a TLC plate with a predetermined limit. To visualize the separation that occurred, the elution results were sprayed with cerium sulfate reagent or observed under UV 254 nm. Plates sprayed with cerium sulfate reagent can be heated to visualize bands on plates that were not otherwise invisible¹³.

Purification using Gravity Column Chromatography (GCC)

Using a GCC for purification was the last step if TLC analysis of vacuum column fractions revealed a dominant compound band. Prior to columnar separation, the fraction was dried or impregnated. The preparation of the column was similar to vacuum columns. The solvent for elution was established based on the TLC test findings. The fraction was purified using GCC with Merck silica 60 GF₂₅₄ (63-200 μm) added to the column to obtain pure isolate. The fraction of the pure isolate compound was then recrystallized to acquire the pure isolate crystals¹³.

Bioactivity Test

Prior to fractionation, separation, and purification, the crude extract samples were tested to establish their bioactivity as an antifeedant against cabbage pests (*Plutella xylostella*). On samples of the pure isolate crystals, bioactivity tests were also conducted against cabbage pests (caterpillars). The bioactivity test was performed by putting a sample of the pure isolate crystals on the surface of freshly cut cabbage leaves measuring 2×2 cm, and then three cabbage caterpillars (*Plutella xylostella*) were then inserted. Observations were conducted over the course of 24 and 48 hours. After 24 and 48 hours of running, the cabbage leaf surface was observed by plotting cabbage leaf sheets on millimeter paper. For the control test, cabbage leaves greased with methanol solvent were used¹³.

Characterization of Pure Isolate Compound

The pure isolate crystal was analyzed using Ultraviolet-Visible (UV-Vis) Spectrophotometer merk Hitachi model 150/20, Fourier Transform-Infrared (FT-IR) Spectroscopy merk Cary 360, and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) merk Shimadzu QP-2010¹³.

RESULT

Extraction of Root Wood Samples from the Datuan Plant

The Datuan plant (*Ficus Vasculosa* Wall. Ex Miq) (**Figure 1**) was acquired from Batu Nangkop Village, North Sungkai District, Kotabumi, North Lampung Regency, Lampung, Indonesia. Samples of Datuan plant in the form of root wood were obtained at approximately 18.75 kg. About 25 L of methanol was required for the maceration of these Datuan root wood samples. The quantity of solvent utilized in one maceration process for a 6 kg dry sample was 8 L methanol. The macerated samples were left in a securely sealed container for 3 days, and the maceration process was conducted three times in succession until the chemical constituent on the samples had been extracted. The products of the maceration were filtered and obtained about 20 L of crude extract filtrate with brownish-yellow color. Using a vacuum rotary evaporator, the crude extract was concentrated and acquired about 28 g of a dark brown concentrated extract. The leftover solvent in the concentrated extract was then evaporated.



Figure 1. Datuan plant (*Ficus Vasculosa* Wall. Ex Miq).

Phytochemical Assay

About 0.5 to 1 g samples of dry concentrated extract were diluted with a little quantity of solvent and put on a porcelain plate. The samples were then tested using Dragendorff, Liebermann Buchard, and 10% NaOH reagents, followed by visualization with cerium sulfate reagent through TLC test with an eluent of n-hexane : ethyl acetate (8:2). The phytochemical assay results are shown in **Table 1**.

Table 1. The results of phytochemical assay of a crude extract of the Datuan plant root wood.

Reagents	Results	TLC Test + Cerium Sulfate Reagent
Dragendorff	A little red precipitate	(+) alkaloids with a crimson band
Liebermann Buchard	The green color of the sample solution appears when added acetic anhydride, and the purple-black arises when added concentrated H ₂ SO ₄ .	(+) steroids and terpenoids with overlapping purple, green, and blue bands
NaOH 10%	The sample solution is roily and presents a yellowish-white precipitate.	(+) flavonoids with a yellow-brown band

Fractionation dan Purification using Column Chromatography (VLC & GCC)

A crude extract sample of 12.5 grams was prepared and impregnated on slightly coarse silica gel (200-400 mesh) with a weight ratio of 1:2 on the column of VLC. In accordance with the separation band of the sample components, the elution of the sample in the column was selected solvents of n-hexane, ethyl acetate, acetone, and methanol according to increasing of their polarity (non-polar to polar). Each column fraction needed 250 mL of solvent. The result of the fractionation process acquired 20 fractions. Using the TLC test, these fractions were examined to discover the same separation bands. According to the TLC findings, the fractions F₁ and F₂ (Ba), F₃-F₅ (Bb), F₆ and F₇ (Bc), and F₈-F₂₀ all exhibit the same banding pattern.

Fraction Ba was non-polar because it was eluted with non-polar solvents (n-hexane), while fractions Bb and Bc were semi-polar because they were eluted with semi-polar solvents (n-hexane and ethyl acetate, respectively). However, the polarity of fraction Bc was more than fraction Bb. Whereas, the fraction F₈-F₂₀ was not conducted column due to the inadequate resolution of the separation band test results from the TLC.

Based on these results, the semi-polar fraction Bb was selected because it had appropriate separation and band resolution of compounds. The fraction Bb was concentrated and obtained up to 3.06 g. The concentrated fraction Bb was then separated by VLC. The results of the separation were acquired 23 fraction C₁ and 28 fraction C₂. From all of these fractions, it was determined that Cb (C₁₄ - C₁₇) and Cb₂ (C₂₆ - C₂₇) were appropriate-separated fractions that can be combined. The combined fractions were re-columned and obtained 22 fraction D. Before the TLC test, all fractions D were allowed until their solvent evaporated. From all fractions D via the TLC test, fractions D₇-D₁₂

were acquired as yellowish-white crystals and displayed virtually pure bands of chemical compounds. Then, the fractions D₇-D₁₂ were recombined and the solvent was evaporated to prepare for further separation using a GCC containing an enhanced polarity n-hexane : ethyl acetate solvent. The gravity column's result obtained 10 fraction E. In all fractions E, only the fraction E₂-E₄ formed crystals with a yellowish-white color, so that the fraction selected was merged. After being washed with methanol, the combined fraction E₂-E₄ yielded n-hexane-soluble white crystals.

Separation through the TLC test

TLC test was used to identify the separation of components in a concentrated sample to determine the solvent ratio in column chromatography. Using the solvents n-hexane : ethyl acetate (8:2) and n-hexane : acetone (8:2), the separation band for non-polar and semi-polar components was observed. The TLC test outcomes of the crude extract and the fraction from extract after the first column displayed numerous components with R_f values ranging from low to high based on the band separation, as shown in **Figure 2**.

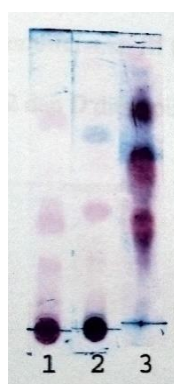


Figure 2. The results of the TLC test : (1) crude extract with n-hexane : acetone (8:2) solvent, (2) crude extract with n-hexane : ethyl acetate (8:2) solvent, and (3) combined fractions F₃-F₅ (Bb) with n-hexane : ethyl acetate (8:2) solvent.

The result of the TLC test of the crude extract with n-hexane : ethyl acetate (8:2) solvent revealed several bands with R_f values of 0.38, 0.67, and 0.88, respectively. Whereas using n-hexane : acetone (8:2) solvent, obtained bands with R_f values of 0.44, 0.67, and 0.88, respectively. This demonstrates that a modest increase in the polarity of the solvent has no effect on the separation's resolution. Using a greater ratio of polar solvents, such as acetone, and acetone-methanol leads to a weak separation band because the sample components are soluted away entirely by the solvent. In addition, the TLC test of fraction F₃-F₅ (Bb) with n-hexane : ethyl acetate (8:2) solvent yielded bands with R_f values of 0.33, 0.55, and 0.70, respectively.

The second column process was carried out to remove components with low R_f values (polar), thereby focusing on acquiring component purification of non-polar and semi-polar compounds. The column results yielded 2 combined fractions Cb and Cb₂ separated effectively. After that, the combined fractions were re-columned and yielded 6 fractions (D₇-D₁₂) from all 22 fractions D with an R_f value of 0.55. The results of the TLC test performed on the Cb, Cb₂, and D fractions, as displayed in **Figure 3**.

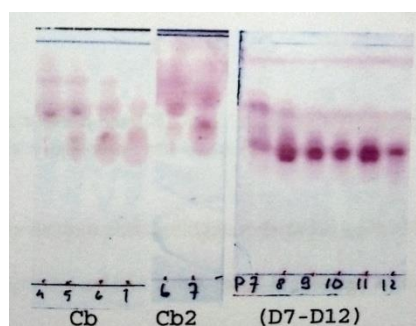


Figure 3. The TLC test results of the combined fractions of Cb, Cb₂, and D₇-D₁₂.

Purification using GCC yielded 2 fractions E₂-E₄ from all 10 fractions E with a separation pattern nearly identical to that of fraction D. Although the TLC test findings for the fractions E₂-E₄ fraction indicated that the chemical compound was not pure, however, from these fractions obtained insoluble yellowish-white crystals. The crystals were washed with methanol and obtained 10 mg of white crystals that were soluble in n-hexane. Then, the crystal isolate was tested on the TLC with n-hexane : ethyl acetate (8:2) solvent and obtained a single band with an R_f value of 0.5. The elution using n-hexane : acetone (8:2) solvent yielded a single band with R_f value of 0.5. The elution using ethyl acetate : acetone (8:2) solvent also yielded a single band with R_f value of 0.90, as shown in **Figure 4**.

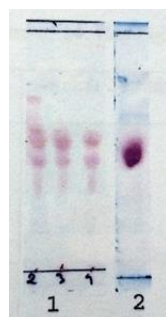


Figure 4. The TLC test results of (1) fraction E₂-E₄; and (2) crystal isolate in n-hexane : ethyl acetate (8:2) solvent.

In addition to the purity test with a solvent ratio, the crystal isolate was also tested for melting point and acquired between 145 - 150 °C. These results of the purity test and the melting point were employed as spectroscopic measurement parameters for the structural elucidation.

Bioactivity test of Crude Extracts and Pure Crystal Isolates

The samples tested for bioactivity against cabbage pests (*Plutella xylostella*) consisted of concentrated crude extract, pure crystal isolates, and methanol as a control. The cabbage leaves were cut to a size of 2x2 cm, and the crude extract was applied to the surface of the leaves. The same procedure was performed on the pure crystal isolates and methanol as a control. The test was conducted in petri dishes coated with perforated plastic to maintain airflow. The observation was conducted at 24 and 48 hours with results, as shown in **Figure 5**.

	Setelah 24 Jam	Setelah 48 Jam
Kontrol MeOH		
Ekstrak		
Murni		

Figure 5. Bioactivity test result against *Plutella xylostella*.

According to the findings of the bioactivity test, the pattern of leaf damage by cabbage caterpillars (*Plutella xylostella*) at 24 and 48 hours greased with methanol as control was more dominant than with the crude extract or pure crystal isolate. This is evident in the leaves that were smeared with crude extract samples and pure crystal isolates that after 24 hours, two out of three cabbage caterpillars were still alive, while one had perished. One of the two surviving cabbage caterpillars pupated after 48 hours of observation, while the other perished. In addition, there was a difference between the degree of leaf damage caused by a sample of crude extract and a sample of pure crystal isolate, with the level of leaf damage caused by a sample of the crude extract being somewhat less than that caused by a sample of pure crystal isolate. This occurred because the crude extract had unidentified mixed chemical compositions, while non-polar steroid components were discovered in the pure crystal isolate samples. Thus, both crude extracts and crystal crystals obtained from Datuan plant root woods have bioactivity against *Plutella xylostella*.

Analysis using UV Spectrophotometer

A 100 ppm pure crystal isolate sample soluted with n-hexane was analyzed using a UV spectrophotometer at the wavelength range of 190 to 390 nm and obtained the UV spectrum as shown in **Figure 6**. The solvent n-hexane was chosen to solute the samples because it did not absorb UV wavelengths. In addition, the sample was also non-polar.

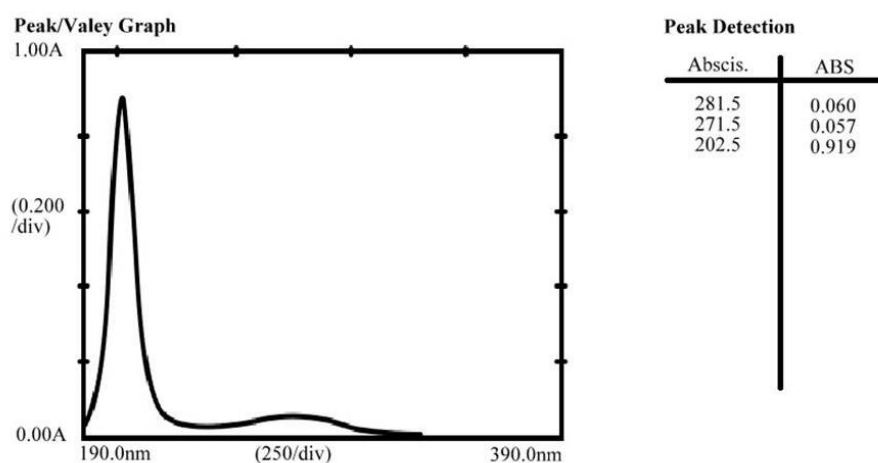


Figure 6. UV spectrum of pure crystal isolate samples.

The obtained UV spectrum contained a band with an absorbance (A) of 0.91 at 202.5 nm, A = 0.057 at 271.5 nm, and A = 0.060 at 281.5 nm, respectively. The molar absorptivity (ϵ) of the samples can be calculated, as shown in **Table 2**. The maximum absorption occurred at a short wavelength of 202.5 nm, hence the sample inferred that has no conjugated C=C bond chromophore group. Nonetheless, it is believed that these samples contained auxochrome groups with non-bonding electrons, such as hydroxyl groups. This auxochrome group absorbs far ultraviolet light (approximately 100 to 190 nm), which results in an $n \rightarrow \pi^*$ transition. Chromophores that binding with auxochromes can shift wavelength absorption¹⁴. The result of this UV spectrum has not been able to compare with the standard spectrum data through other references. Therefore, additional analysis, such as IR and MS, is required to identify these compounds.

Table 2. The calculated result of the molar absorptivity (ϵ) of the pure crystal isolate sample.

Wavelength (λ)	Absorbance (A)	Molar absorptivity (ϵ) ($\log \epsilon$)
202.5 nm	0.919	4.5803
271.5 nm	0.057	3.3729
281.5 nm	0.060	3.3952

Description:

Mass of isolated compound = 10 mg, utilized 0.1 mg = 0.001g

Mr of b-sitosterol ($C_{29}H_{50}O$) = 414 gr/mol

Volume of n-hexane solvent = 10 mL = 0.01 L

Cell thickness (cuvette) = 1 cm

Analysis using FT-IR Spectroscopy

The IR spectrum was obtained from the analysis of the pure crystal isolate samples using FT-IR spectroscopy, as shown in **Figure 7**.

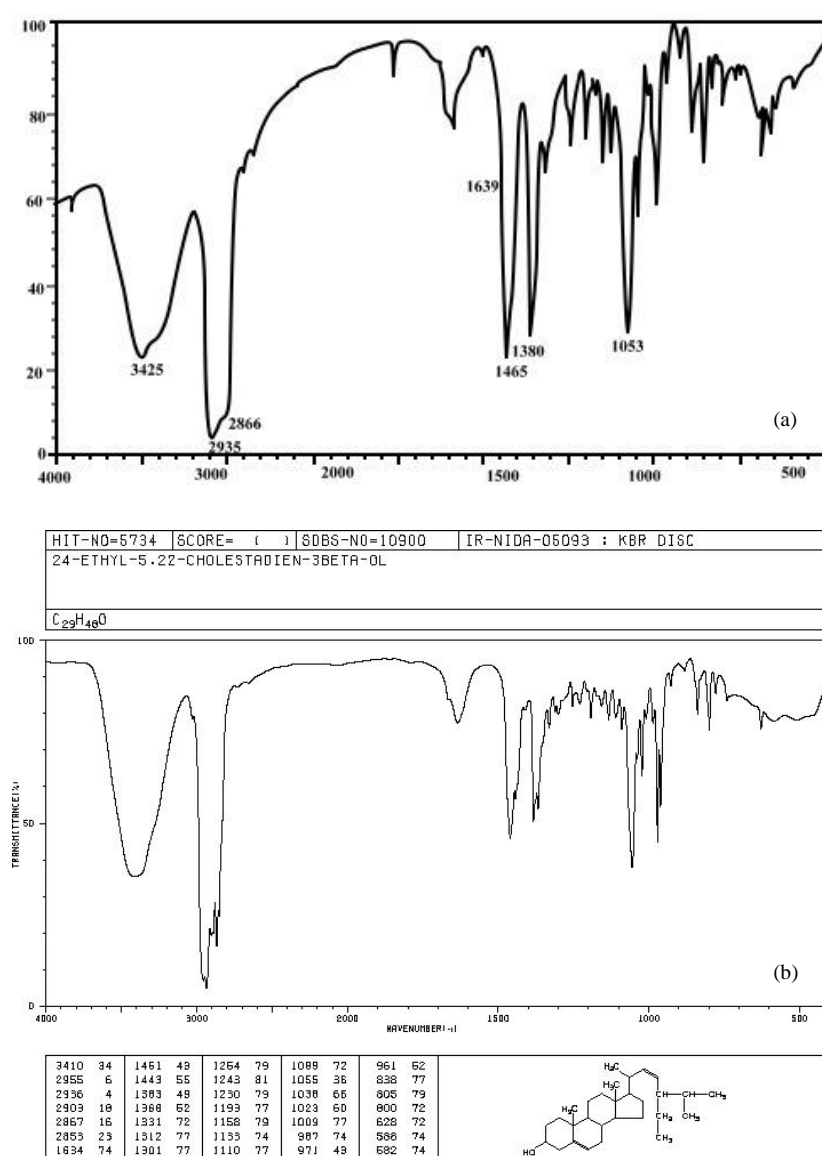


Figure 7. IR spectrum of (a) pure crystal isolate samples and (b) standard comparison data¹⁵.

The IR spectrum of pure crystal isolate revealed absorption at a wave number of 3425 cm^{-1} , indicating the existence of stretching vibrations of the O-H functional group. The absorption at wave numbers 2935 cm^{-1} and 2866 cm^{-1}

was generated from C-H sp^3 and C-H sp^2 stretching vibrations, respectively. At a wave number of 1639 cm^{-1} , absorption of the unconjugated C=C stretching vibration was seen. The absorption at wave numbers 1465 cm^{-1} and 1380 cm^{-1} was due to C-H sp^3 bending vibrations of the isopropyl functional group. At the wave number 1053 cm^{-1} , appeared a typical absorption of the O-H (2°) bending vibration from β -sitosterol. These findings were appropriate with the IR spectrum standard comparison data given by Azeez et al.¹⁵. MS analysis was also performed to confirm in further detail that this pure crystal isolate was produced from β -sitosterol.

Analysis using GC-MS

The MS spectrum was acquired from the analysis of pure crystal isolate samples using GC-MS, as shown in **Figure 8**.

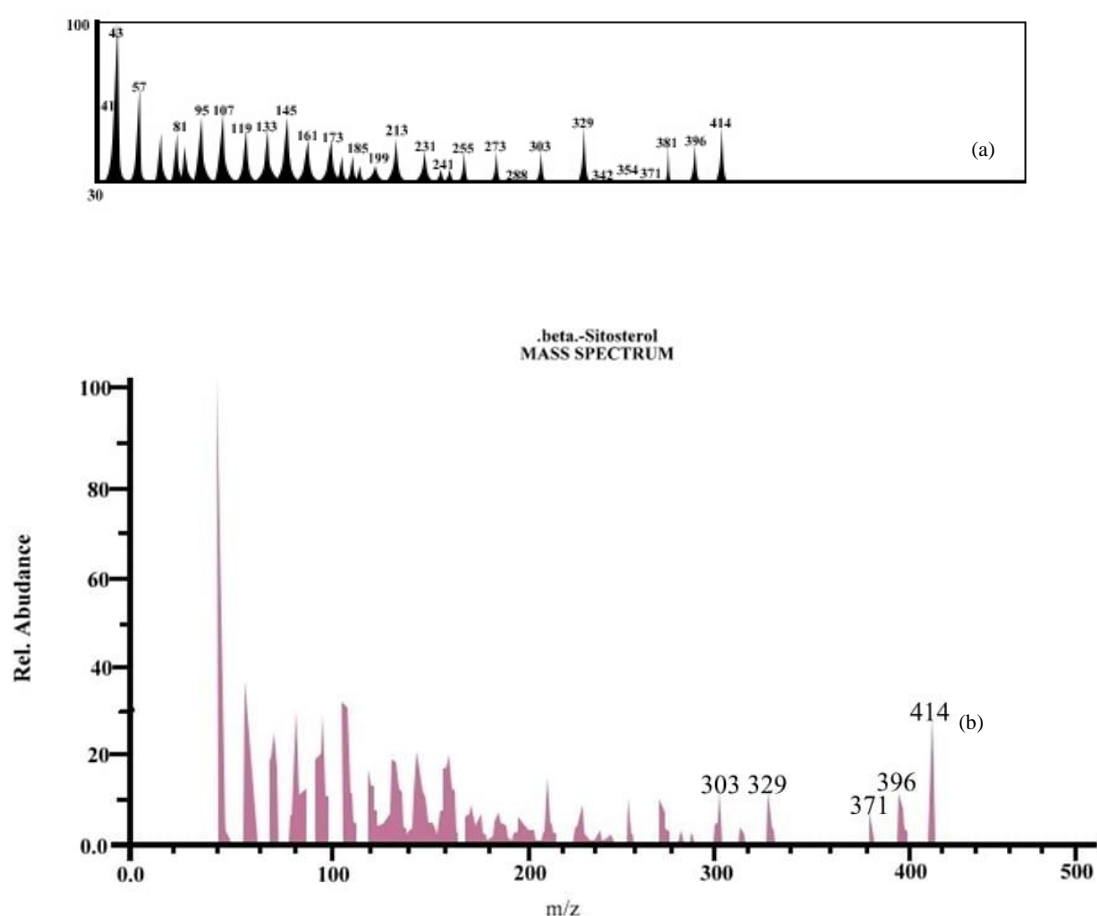


Figure 8. MS spectrum of (a) pure crystal isolate samples and (b) standard comparison data¹⁵.

The MS spectrum exhibited an m/z fragmentation pattern with $M^+ = 414$ and was detected at $m/z = 43$ as the base summit. Other fragmentation peaks appeared at m/z of 396, 381, 329, 273, and 255. Compound (**1**) with $M^+ = 414$ releases H_2O molecules to create compound (**1a**) with $m/z = 396$, as shown at the fragmentation pattern (**Figure 9**). By releasing CH_3 radicals, further fragmentation of compound (**1a**) produced compound (**1b**) with $m/z = 281$. In addition, the fragmentation of compound (**1**) yielded compound (**1c**) with $m/z = 329$ through the release of the C_6H_{11} radical and the H_2 molecule, as well as compound (**1d**) with $m/z = 273$ via the release of the $C_{10}H_{19}$ radical and H_2 molecules. Moreover, the release of H_2O molecules of compound (**1d**) yielded the compound (**1e**) with $m/z = 255$. Comparing the MS fragmentation pattern of the pure crystal isolate sample analysis to the standard MS spectrum data reported by Azeez et al.¹⁵ revealed that the fragmentation pattern was similar.

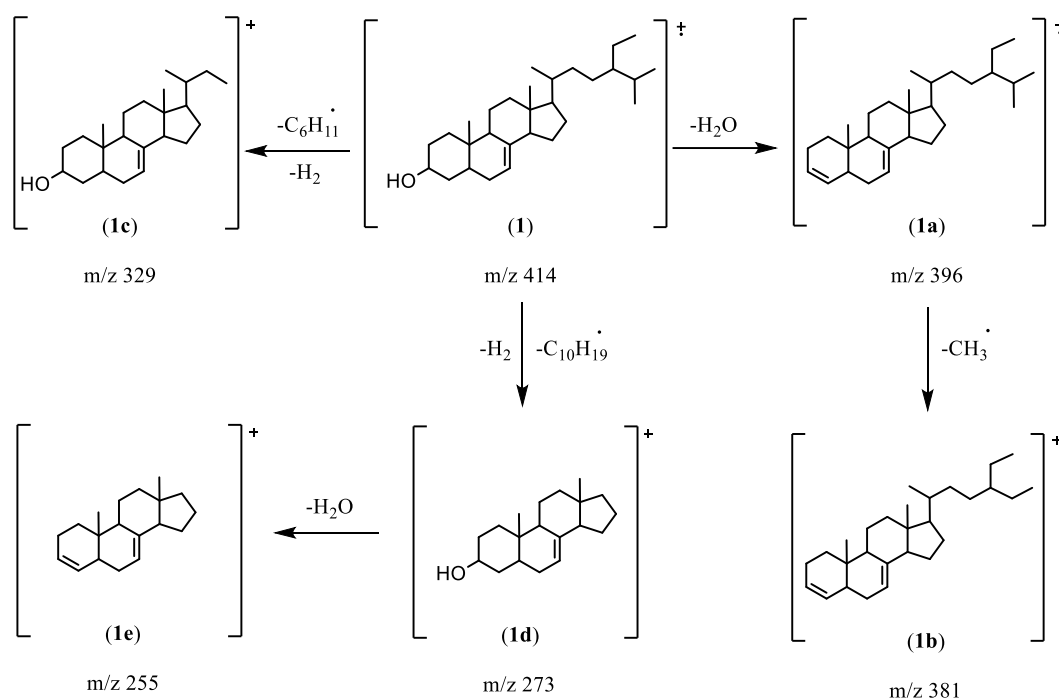


Figure 9. Fragmentation pattern of β -sitosterol compounds.

DISCUSSION

M^+ obtained on the MS spectrum proved that the compound of the pure crystal isolate had $M_r = 414$ g/mol. Based on the nitrogen rule, compounds with even molecular weights comprised solely C, H, and O atoms. If the compound contains nitrogen, it must have an even number of N atoms¹⁴. However, this compound was not contained N atoms, corresponding to the IR spectrum. Therefore, the estimated molecular formula was $C_{29}H_{50}O$.

To establish the structure of the compound of pure crystal isolate based on its molecular formula, the double bond equivalents (DBE) index was calculated and determined using the following formula:

$$\text{DBE index} = \text{number of C atoms} - (\text{number of H atoms} : 2) + 1$$

$$\text{DBE index} = 29 - (50 : 2) + 1$$

$$\text{DBE Index} = 29 - 25 + 1 = 5$$

The DBE index acquired value of 5 indicated the presence of four cyclic structures and one double bond, as explained by Suhartati¹⁴. Accordingly, the compound structure of pure crystal isolate was confirmed as a β -sitosterol.

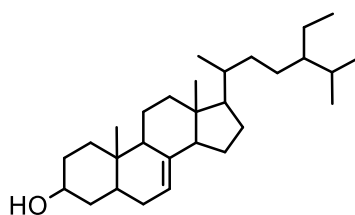


Figure 10. Structure of (3 β , 5 α , 24R)-stigmast-7-en-3-ol or β -sitosterol.

For structure elucidation, the compound isolated from Datuan plants acquired white crystals with a melting point between 145 - 150 °C. In addition, the structure of the compound was validated and obtained by UV absorption at a maximum wavelength of 202.5 nm, which indicated the presence of an O-H functional group. The O-H functional group (2°) of β -sitosterol was also verified by IR at a typically wave number 3425 cm^{-1} and generally at 1053 cm^{-1} . According to the MS data, the compound has a molecular weight (M^+) of 414 g/mol. The fragmentation pattern of the compound was also appropriate with the structure of β -sitosterol, and a DBE index was obtained of 5, indicating that it contains four cyclic structures and one double bond. Therefore, it can be concluded that the compound obtained is (3 β , 5 α , 24R)-stigmast-7-en-3-ol or β -sitosterol, as shown in **Figure 10**.

CONCLUSION

In conclusion, we have successfully isolated (3 β , 5 α , 24R)-stigmast-7-en-3-ol or β -sitosterol (steroid) from the root wood extract of the Datuan plant (*Ficus vasculosa* Wall. ex Miq). The compound was obtained as a white crystal

with a melting point between 145 - 150 °C. In addition, the bioactivity of the compound as an antifeedant against cabbage pests (*Plutella xylostella*) was demonstrated by the observation result that two out of three cabbage caterpillars were still alive, while one had perished after 24 hours. At 48 hours, one of the two surviving cabbage caterpillars pupated while the other perished. Therefore, this compound has the potential to be utilized as an antifeedant against cabbage pests.

CONFLICT OF INTEREST

The authors state that no conflicts of interest exist.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Research and Community Services Institution, Universitas Lampung has granted funding for Basic Research Grants (Penelitian Dasar) 2022.

AUTHORS' CONTRIBUTION

All author has made an intellectual significant, and direct contribution to the work and authorized it for publication.

REFERENCES

1. Sandabe UK, Onyeyili PA, and Chibuzo GA. Phytochemical screening and effect of aqueous extract of *Ficus sycomorus* L.(Moraceae) stem bark on muscular activity in laboratory animals. *Journal of ethnopharmacology*. 2006;104(1-2):283-285. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.08.066>
2. Chawla A, Kaur R, and Sharma AK. *Ficus carica* Linn.: A review on its pharmacognostic, phytochemical and pharmacological aspects. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*. 2012;1(4):215-232. <https://eijppr.com/LwYR9QS>
3. Mawa S, Husain K, and Jantan I. *Ficus carica* L.(Moraceae): phytochemistry, traditional uses and biological activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013;2013:1-8. <https://doi.org/10.1155/2013/974256>
4. Gargiullo MB. Invasive Plants of Asian Origin Established in the United States and Their Natural Enemies. *The Journal of the Torrey Botanical Society*. 2005;132(2):375-376. [https://doi.org/10.3159/1095-5674\(2005\)132\[375a:BR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3159/1095-5674(2005)132[375a:BR]2.0.CO;2)
5. Shi YX, Xu YK, Hu HB, Na Z, and Wang WH. Preliminary assessment of antioxidant activity of young edible leaves of seven *Ficus* species in the ethnic diet in Xishuangbanna, Southwest China. *Food Chemistry*. 2011;128(4):889-894. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.113>
6. Bertolotti LL, Skoronski E, Schittler L, and Kempka AP. Extracts of Leaves of *Ficus auriculata* Lour.: antioxidant, antimicrobial and phytotoxic activity. *Agriculturae Conspectus Scientificus*. 2018;83(4):321-328. <https://hrcak.srce.hr/207932>
7. Kubo M, Yatsuzuka W, Matsushima S, Harada K, Inoue Y, Miyamoto H, Matsumoto M, and Fukuyama Y. Antimalarial phenanthroindolizine alkaloids from *Ficus septica*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2016;64(7):957-960. <https://doi.org/10.1248/cpb.c16-00181>
8. Qian-wei WE, Xue-li CH, Yi-yan ZH, Yu-hua GU, Han-hong XU, and Jing-jing LI. Bioactivities and Chemical Constituents of *Ficus vasculosa* Leaves Extracts. *Natural Product Research and Development*. 2016;28(7):10-55. <http://www.trew.ac.cn/EN/10.16333/j.1001-6880.2016.7.012>
9. Hendrayana Y, Widodo P, Kusmana C, and Widhiono I. Diversity and distribution of figs (*Ficus* spp.) across altitudes in Gunung Tilu, Kuningan, West Java, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. 2019;20(6):1568-1574. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d200612>
10. Yusuf R. Sebaran ekologi dan keanekaragaman *Ficus* spp. di Indonesia. *Berkala Penelitian Hayati Edisi Khusus*. 2011;5A:83-91.
11. Putra KW, Pitoyo A, Nugroho GD, Rai M, and Setyawan AD. Phytochemical activities of *Ficus* (Moraceae) in Java Island, Indonesia. *International Journal of Bonorowo Wetlands*. 2020;10(2):98-125. doi: 10.13057/bonorowo/w100204
12. Bahri S, Ambarwati Y, and Marlina L. Identification of Phenyl Propanoid Compound Isolated from Root Bark Datuan (*Ficus vasculosa* Wall. Ex Miq) and Antibacterial Activity Test on *Escherichia coli*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2020; 537(1): 012-046. doi:10.1088/1755-1315/537/1/012046
13. Bahri S, Ambarwati Y, Marlina L, Hadi S, and Fitriani V. The Attractant Bioactivity Test of Semi-Polar Fraction of the Datuan Stem Bark (*Ficus vasculosa* Wall. Ex Miq) against Warehouse Pest (*Sitophilus oryzae* L.). *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2021;15(4):2125-2135. <https://doi.org/10.22207/JPAM.15.4.35>
14. Suhartati T. Dasar-dasar spektrofotometri UV-Vis dan spektrometri massa untuk penentuan struktur senyawa organik. *Aura Bandar Lampung*. 2017; 1(1). ISBN 978-602-6565-39-6. <http://repository.lppm.unila.ac.id/2700/>
15. Azeez RA, Abaas IS, and Kadhim EJ. Isolation and Characterization of β -sitosterol from *Elaeagnus angustifolia* cultivated in Iraq. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2018;11(11):442-446. <http://dx.doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i11.29030>