

**ISOLASI DAN UJI TOKSISITAS METABOLIT SEKUNDER  
EKSTRAK *n*-HEKSANA KULIT BATANG TUMBUHAN  
*Polyalthia pulchra* var. *angustifolia* King  
(ANNONACEAE)**

Yuhendri<sup>1</sup>, Jasril<sup>2</sup>, Yuharmen<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Program Studi S1 Kimia

<sup>2</sup>Dosen Kimia Organik, Jurusan Kimia

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau

Kampus Binawidya Pekanbaru, 28293, Indonesia.

you.henry.chem@gmail.com

**ABSTRACT**

The secondary metabolites of the stem bark of *Polyalthia pulchra* were isolated and their toxicity activity assayed using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) method. The sample was extracted by maceration method using *n*-hexane solvent. Structures of the isolated compounds were conducted using Gas Chromatography and Mass Spectrometry (GC-MS). The dried sample produced 3.21 g *n*-hexane extract (0.25%) and 0.032 g 2<sup>nd</sup> fraction of *n*-hexane (FH2) (0.0025%). The toxicity assay showed that *n*-hexane extract and FH2 fraction was toxic with LC<sub>50</sub> 5.9 and 7.1 ppm. From the results of GC-MS analysis, it is shown that FH2 fraction contains campesterol, stigmasterol, and  $\gamma$ -sitosterol compounds with retention times 75.605, 76.568 and, 78.172 minutes, respectively.

Keywords : Brine Shrimp Lethality Test (BSLT), GC-MS, *Polyalthia pulchra*.

**ABSTRAK**

Senyawa metabolit sekunder dari kulit batang tumbuhan *Polyalthia pulchra* telah diisolasi dan aktivitas toksisitas diuji dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Sampel diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut *n*-heksana. Struktur senyawa hasil isolasi ditentukan dengan Kromatografi Gas dan Spektrometri Massa (GC-MS). Sampel kering menghasilkan 3,21 g (0,25%) ekstrak *n*-heksana dan 0,032 g (0,0025%) fraksi 2 ekstrak *n*-heksana (FH2). Hasil uji toksisitas menunjukkan ekstrak *n*-heksana dan fraksi FH2 bersifat toksik dengan LC<sub>50</sub> 5,9 dan 7,1 ppm. Hasil analisis GC-MS menunjukkan bahwa fraksi FH2 mengandung senyawa campesterol, stigmasterol dan  $\gamma$ -sitosterol dengan waktu retensi berturut-turut adalah 75,605; 76,568 dan 78,172 menit.

Kata kunci : *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), GC-MS, *Polyalthia pulchra*.

**PENDAHULUAN**

Famili Annonaceae terkenal sebagai penghasil senyawa metabolit sekunder yang sangat bervariasi. Salah satu contohnya adalah kelompok alkaloid, terutama golongan isokuinolin yang merupakan senyawa metabolit sekunder terbesar yang dihasilkan serta terdapat juga golongan lain seperti indol dan antrasen. Senyawa metabolit sekunder lain

yang ditemukan dari famili ini adalah flavonoid, terpenoid, fitosterol (Leboeuf dkk, 1982) dan xanthone (Teruna, 2006). Hasil uji fitokimia terhadap tumbuhan *Polyalthia pulchra* khususnya kulit batang, menunjukkan bahwa tumbuhan ini mengandung senyawa golongan alkaloid, fenolik, steroid, terpenoid dan saponin.

Senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam tumbuhan *Polyalthia pulchra* masih sangat jarang diteliti, padahal jika ditinjau dari tumbuhan genus *Polyalthia* diketahui banyak digunakan oleh masyarakat secara tradisional sebagai obat. Berdasarkan pendekatan etnobotani masyarakat Talang Mamak yang ada di daerah Taman Nasional Bukit Tigapuluh kabupaten Indragiri Hulu provinsi Riau Indonesia menggunakan spesies *Polyalthia rumpii* sebagai obat infeksi pada mata (Zuhud, 1999).

Kanker merupakan salah satu penyakit pembunuh nomor satu di dunia dan senyawa-senyawa alami telah terbukti kuat dalam penyembuhan kanker tersebut (Drahl, 2010). Pada umumnya tumbuhan yang berkhasiat terhadap antikanker adalah yang mengandung senyawa-senyawa yang bersifat toksik (Meyer dkk, 1982). Banyak spesies dari genus *Polyalthia* menunjukkan aktivitas yang baik terhadap hasil uji toksisitas (*Brine shrimp bioassay*) seperti akar dan kulit batang tumbuhan *Polyalthia cauliflora* (Ghani dkk, 2011) serta kulit batang tumbuhan *Polyalthia rumpii* (Wang dkk, 2012).

## METODE PENELITIAN

Kulit batang tumbuhan *Polyalthia pulchra* diambil pada bulan November 2012 di daerah hutan lindung Taman Nasional Bukit Tigapuluh suku pedalaman Talang Mamak, Kabupaten Indragiri Hulu-Riau. Pengambilan sampel ini dilakukan di desa Siambul kecamatan Seberida pada ketinggian 80 m dari permukaan laut, 00° 46' 38,2" Lintang Selatan dan 102° 27' 31,6" Bujur Timur. Kulit batang *P. pulchra* terlebih dahulu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan pada temperatur ruang dan dijaga agar tidak terkena sinar matahari secara langsung hingga beratnya konstan. Setelah kering, kemudian dihaluskan sehingga diperoleh serbuk kering kulit batang *P. pulchra* dan siap untuk diekstraksi.

### a. Ekstraksi dan Isolasi

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi. Serbuk kering kulit batang tumbuhan *P. pulchra* sebanyak 1300 g direndam (dimaserasi) dalam bejana ekstraksi dengan pelarut *n*-heksana selama 3x24 jam pada suhu kamar, kemudian diultrasonikasi selama 30 menit dan disaring. Proses ini dilakukan 4 kali pengulangan, maserat yang diperoleh dikumpulkan menjadi satu dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*, sehingga diperoleh ekstrak total *n*-heksana. Dengan perlakuan yang sama residu yang telah kering dimaserasi kembali dengan pelarut metanol untuk mengekstrak senyawa-senyawa yang bersifat polar.

Ekstrak *n*-heksana sebanyak 3 g dilakukan pemisahan senyawa dengan kolom kromatografi gravitasi menggunakan silika gel 60 (70-230 mesh) dengan diameter 2 cm. Pemisahan dilakukan dengan elusi secara bergradien menggunakan pelarut *n*-heksana dan etilasetat. Hasil pemisahan ditampung dalam vial yang telah diberi nomor. Pemisahan ini menghasilkan senyawa berbentuk kristal berwarna kuning pucat, kristal tersebut digabungkan berdasarkan *R<sub>f</sub>*-nya dan dimurnikan dengan rekristalisasi. Kristal

senyawa yang diperoleh dari hasil pemisahan tersebut kemudian direkristalisasi untuk mendapatkan senyawa yang lebih murni.

**b. Analisis Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)**

Penentuan struktur senyawa-senyawa dari F2H dilakukan dengan spektrometer GS-MS. Analisis dilakukan menggunakan GC-MS Agilent 6890 N 2006 dengan kolom DB 5 MS dimensi 30m x 250 $\mu$ m x 0,25 $\mu$ m. Kondisi sistem adalah suhu oven 310 $^{\circ}$ C, detektor 310 $^{\circ}$ C, injektor 305 $^{\circ}$ C, suhu program (awal 50 $^{\circ}$ C, kenaikan 3.50 $^{\circ}$ C per menit hingga suhu maksimal 310 $^{\circ}$ C), waktu analisis 100 menit, tekanan kolom 14,12 psi dengan laju alir 1,7 mL per menit dan volume injeksi 2  $\mu$ L.

**c. Uji toksisitas dengan metode *Shrimp Lethality Test* (BSLT)**

Pengujian dilakukan terhadap ekstrak total *n*-heksana dan fraksi 2 *n*-heksana (F2H) dengan konsentrasi 1000, 100 dan 10 ppm. Pembuatan larutan sampel uji dilakukan dengan metode pengenceran bertingkat. Sebanyak 20 mg masing-masing sampel uji dilarutkan dalam 2 ml metanol maka diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 10000 ppm. Masing-masing larutan tersebut dipipet sebanyak 0,5 ml dan ditambahkan 5 ml metanol hingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1000 ppm setelah penambahan air laut. Larutan induk diatas dipipet lagi sebanyak 0,5 ml dan ditambahkan 5 ml metanol hingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 100 ppm setelah penambahan air laut dan untuk konsentrasi 10 ppm dibuat dari sampel uji 100 ppm dengan cara yang sama. Masing-masing larutan dipipet sebanyak 0,5 ml dimasukkan ke dalam vial uji dengan pengulangan masing-masing 3 kali.

Pelarut dari masing-masing vial uji dibiarkan menguap dan senyawa uji dilarutkan kembali dengan 50  $\mu$ L DMSO, selanjutnya ditambahkan air laut hingga hampir mencapai batas kalibrasi. Larva *Artemia salina* dimasukkan pada masing-masing vial sebanyak 10 ekor. Air laut ditambahkan lagi beberapa tetes hingga batas kalibrasi, kematian larva *A. salina* diamati setelah 24 jam. LC<sub>50</sub> dihitung dengan metode kurva menggunakan tabel probit (Meyer dkk, 1982 dan Harefa, 1997). Untuk kontrol dilakukan dengan cara yang sama namun dilakukan tanpa memasukkan sampel ke dalam vial uji.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**a. Ekstraksi dan isolasi**

Serbuk kering kulit batang *Polyalthia pulchra* sebanyak 1300 g dimaserasi secara bertingkat dengan menggunakan pelarut *n*-heksana dan metanol menghasilkan ekstrak *n*-heksana dan ekstrak metanol, kedua ekstrak tersebut berbentuk seperti karamel dengan bau khas. Hasil maserasi tersebut dapat dilihat pada Tabel 1. Ekstrak tersebut kemudian dilakukan skrining fitokimia untuk menentukan kandungan senyawanya. Hasil skrining tersebut menunjukkan bahwa ekstrak *n*-heksana mengandung senyawa golongan steroid dan alkaloid.

Tabel 1: Hasil maserasi kulit batang *P. pulchra*

Berat sampel (g)	Ekstrak <i>n</i> -heksana		
	Berat (g)	Rendemen (%)	Warna
1300	3,21	0,25	Cokelat kehitaman

### b. Hasil pemisahan dengan kromatografi kolom

Ekstrak *n*-heksana (3 g) dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom. Proses pemisahan senyawa dilakukan dengan sistem gradien elusi, artinya kepolaran eluen yang digunakan untuk mengelusi sampel dinaikkan secara bertahap sehingga menghasilkan 3 fraksi berdasarkan nilai *Retardation factor* (*R<sub>f</sub>*) yaitu fraksi 1 dan fraksi 2 berupa kristal jarum berwarna kuning pucat dan fraksi 3 berupa padatan kental berwarna kuning kecokelatan. Data hasil kolom tersebut dapat dilihat pada Tabel 2. Fraksi 2 dilanjutkan dengan pemisahan/pemurnian menggunakan kromatografi kolom, diperoleh 13 vial, vial 10-12 digabungkan dan dilakukan rekristalisasi sehingga diperoleh senyawa fraksi 2 *n*-heksana (F2H) sebanyak 0,032 g (0,0025%) dengan titik lebur 146-148°C. Bentuk kristal F2H dapat dilihat pada Gambar 1.



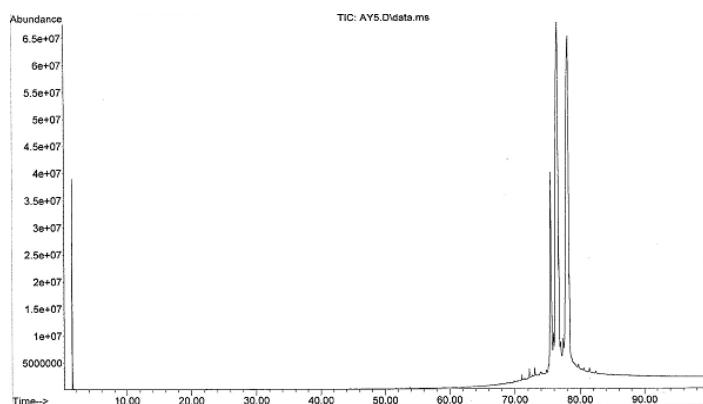
Gambar 1. Senyawa fraksi 2 *n*-heksana (F2H)

Tabel 2: Data hasil kromatografi kolom ekstrak *n*-heksana

Fraksi	Berat (g)	Bentuk	<i>R<sub>f</sub></i>
1	0,015	Kristal	1
2	0,312	Kristal	0,8
3	2,619	Padatan (karamel)	0,5

### c. Analisis Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

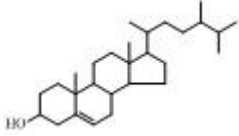
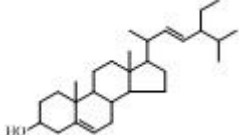
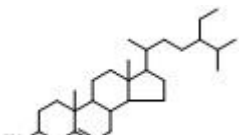
Penentuan komponen senyawa yang terkandung dalam senyawa F2H dilakukan analisis dengan *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS). Senyawa-senyawa yang berhasil dianalisis dari GC-MS tersebut dapat dilihat pada Tabel 3.



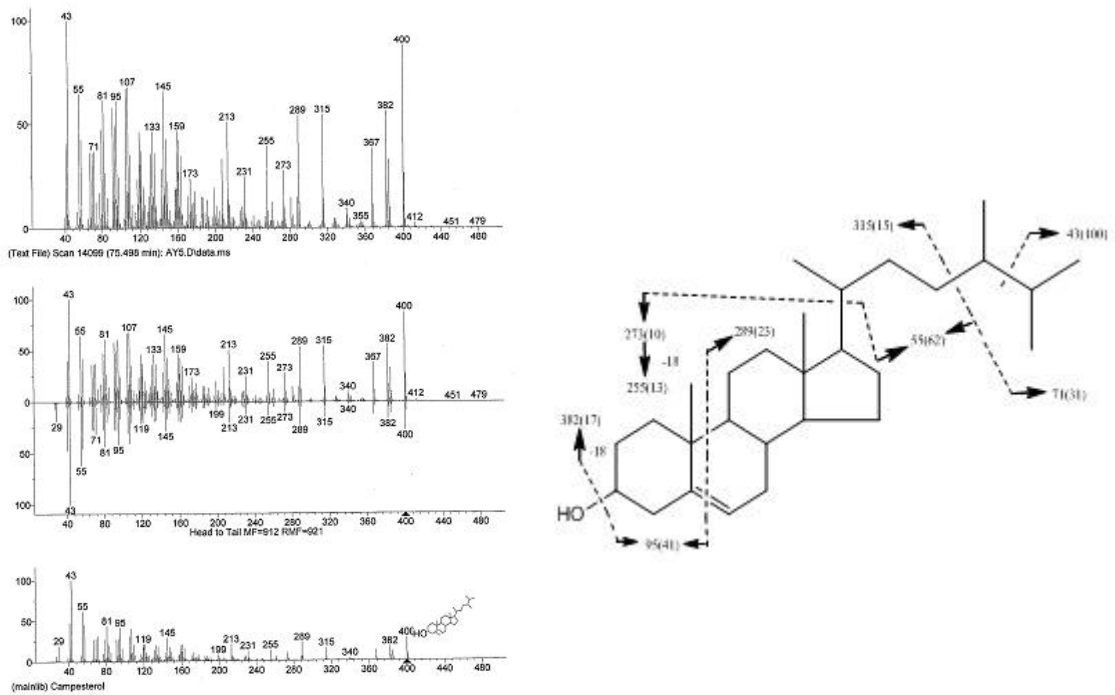
Gambar 2. Spektrum GC fraksi 2 *n*-heksana (F2H)

Hasil analisis GC-MS kristal F2H, terdeteksi 3 puncak dominan (tidak murni) yang berarti sampel mengandung 3 senyawa utama yaitu pada waktu retensi ( $t_R$ ) 75,605 (F2H<sub>1</sub>); 76,568 (F2H<sub>2</sub>) dan 78,172 menit (F2H<sub>3</sub>). Hal ini terjadi karena ekstrak *n*-heksana mengandung 3 senyawa yang memiliki berat molekul dan kepolaran yang hampir sama, sehingga sulit untuk dipisahkan dengan metode pemisahan konvensional seperti yang terlihat pada Gambar 2.

Tabel 3: Analisis GC-MS dari senyawa fraksi 2 ekstrak *n*-heksana (F2H)

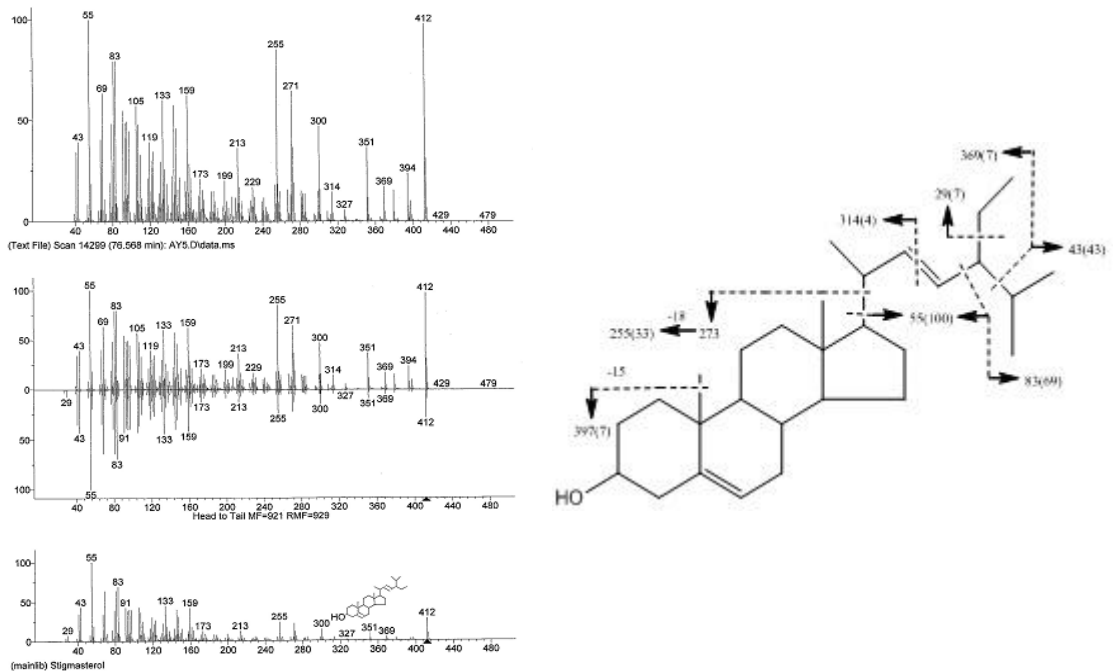
Puncak	Simbol senyawa	Waktu retensi (menit)	Persentase kelimpahan (%)	Senyawa perkiraan		Prob. (%)
				Nama senyawa	Struktur senyawa	
1	F2H <sub>1</sub>	75,605	10,55	<i>Campesterol</i>		63,7
2	F2H <sub>2</sub>	76,568	35,32	<i>Stigmasterol</i>		83,3
3	F2H <sub>3</sub>	78,172	38,82	<i>γ-Sitosterol</i>		77,5

Senyawa F2H<sub>1</sub> (puncak pertama) diduga campesterol dengan probabilitas 63,7% memiliki waktu retensi 75,605 menit dengan luas area puncak 10,552%, massa molekul relatif ( $m/z$ ) 400 dan rumus molekul C<sub>28</sub>H<sub>48</sub>O. Dugaan ini diperoleh dari hasil perbandingan antara pola fragmentasi senyawa analisis dengan campesterol. Pola fragmentasi senyawa ini dapat dilihat pada Gambar 3. Puncak dasar (*base peak*)  $m/z$  43 berasal dari C<sub>3</sub>H<sub>7</sub><sup>+</sup>. Pemecahan  $m/z$  382 dari C<sub>28</sub>H<sub>47</sub><sup>+</sup> (M<sup>+</sup>-18) dihasilkan oleh lepasnya gugus H<sub>2</sub>O dari puncak ion molekul dan pemecahan  $m/z$  55 berasal dari lepasnya gugus C<sub>4</sub>H<sub>7</sub><sup>+</sup> (M<sup>+</sup>-345).



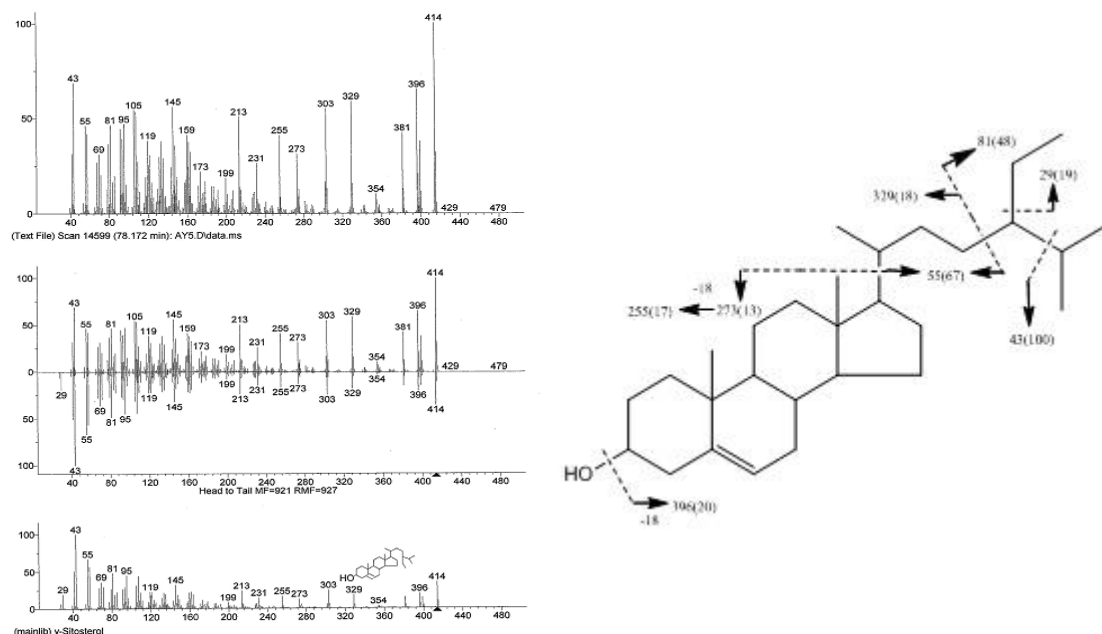
Gambar 3. Pola fragmentasi MS senyawa F2H<sub>1</sub> (campesterol)

Senyawa F2H<sub>2</sub> (puncak kedua) diduga stigmasterol dengan probabilitas 83,3% memiliki waktu retensi 76,568 menit dengan luas area puncak 35,315%, massa molekul relative (m/z) 412 dan rumus molekul C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>O. Pola fragmentasi senyawa ini dapat dilihat pada Gambar 4. Puncak dasar (*base peak*) m/z 55 berasal dari pemecahan C<sub>4</sub>H<sub>7</sub><sup>+</sup> (M<sup>+</sup>-357), pemecahan m/z 397 terjadi akibat lepasnya salah satu gugus metil (M<sup>+</sup>-15).



Gambar 4. Pola fragmentasi MS senyawa F2H<sub>2</sub> (stigmasterol)

Senyawa F2H<sub>3</sub> (puncak ketiga) diduga  $\gamma$ -sitosterol dengan probabilitas 77,5% memiliki waktu retensi 78,172 menit dengan luas area puncak 38,818%, massa molekul relatif (m/z) 414 dan rumus molekul C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O. Pola fragmentasi senyawa ini dapat dilihat pada Gambar 5. Puncak dasar m/z 43 berasal dari pemecahan C<sub>3</sub>H<sub>7</sub><sup>+</sup> (M<sup>+</sup>-371).



Gambar 5. Pola fragmentasi MS senyawa F2H<sub>3</sub> ( $\gamma$ -sitosterol)

#### d. Uji toksisitas

Bioaktivitas dari ekstrak dan fraksi F2H ditentukan melalui uji toksisitas dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Aktivitas toksisitas ekstrak dan senyawa tersebut dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4: Hasil uji toksisitas ekstrak *n*-heksana dan senyawa F2H

No.	Sampel	LC <sub>50</sub> (ppm)
1.	Ekstrak <i>n</i> -heksana	5,9
2.	Fraksi 2 <i>n</i> -heksana (F2H)	7,1

Berdasarkan data hasil uji tersebut ekstrak *n*-heksana dan fraksi F2H yang diujikan memiliki sifat toksik yang tinggi karena memiliki harga LC<sub>50</sub> lebih kecil dari standar ekstrak (kecil atau sama dengan 1000 ppm) dan senyawa murni (kecil atau sama dengan 200 ppm) (Meyer dkk, 1982) dan ekstrak *n*-heksana merupakan yang paling toksik dengan LC<sub>50</sub> dapat dilihat pada Tabel 4.

### KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa kulit batang tumbuhan *Polyalthia pulchra* mengandung senyawa golongan saponin, terpenoid, steroid, alkaloid dan fenolik. Hasil analisis GC-MS menunjukkan bahwa fraksi F2H mengandung tiga komponen utama yaitu campesterol, stigmasterol dan  $\gamma$ -sitosterol. Ekstrak *n*-heksana dan senyawa F2H bersifat toksik dan berpotensi sebagai antikanker dengan LC<sub>50</sub> 5,9 dan 7,1 ppm.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis sangat berterima kasih kepada Bapak Drs. Yuharmen, M.Si dan Bapak Prof. Dr. Jasril, M.S yang telah bersedia meluangkan waktu, tenaga dan pikiran dalam memberikan bimbingan dan arahan kepada penulis selama melakukan penelitian serta kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- Drahl, C. 2010. *Cancer prevention, naturally*. Chem. Eng. News. American Chemical Society.
- Ghani, N.A., Ahmat, N. and Ismail, NH. 2011. *Contituent chemical and cytotoxix activity from Polyalthia cauliflora var. cauliflora*. **6**, 74-82.
- Harefa, F. 1997. *Pembudidayaan Artemia salina untuk pakan udang dan ikan*. Swadaya, Jakarta.
- Leboeuf, M., Cave, A., Bhaumik, P. K., Mukherjee and Mukherjee, R. 1982. The Phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochem.* **21**(12), 2783-2813.
- Meyer, B.N.R., Ferrigni, J.E., Putnam, L.B., Jacosen, D.E., Nicholas., dan McLaughin, J.L. 1982. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* **45**, 31-34.
- Teruna, H. Y. 2006. *Phytochemical study of Annonaceae plant from Sumatera, Indonesia*. Centre for phytochemistry and pharmakology. Southern Cross University, Lismore, Australia.
- Wang, Tianshan, Yuan Y., Wang, J., Han, C. and Chen, G. 2012. *Anticancer activities of constituents from the stem of Polyalthia rumphii*. Journal of Pharmaceutical Sciences. **25**, 352-356.
- Zuhud, E. A. M., Medi, L., Rahayu, M. Sedayu, A. Teruna, H. Y. dan Effendi, J. 1999. *Ekspedisi biota medika di Taman Nasional Bukit Tigapuluh dan cagar biosfer Bukit Duabelas provinsi Riau dan Jambi*, Laporan (Expedition of medicinal plants of Tigapuluh Hill National Park and Twelve Hill National reserve in Riau and Jambi province: A report). Departemen Kesehatan RI dengan Institute Pertanian Bogor, Universitas Indonesia, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Bogor, pp 56-68.