

**ISOLASI METABOLIT SEKUNDER DAN UJI TOKSISITAS EKSTRAK
METANOL DAGING BUAH TANAMAN *Cerbera odollam* Gaertn.
(APOCYNACEAE)**

Nelma Yeni, Hilwan Yuda Teruna, Jasril

**Mahasiswa Program Studi S1 Kimia
Bidang Kimia Organik Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Kampus Binawidya Pekanbaru, 28293, Indonesia
*yeninay@yahoo.com***

ABSTRACT

Cerbera odollam Gaertn is a plant found in Indonesia which is used as traditional medicine. Isolation and toxicity assay on fruit flesh of this plant has been done. The methanol macerating method was applied to isolate the secondary metabolites from part of this plant. The separation was carried out by vacuum liquid chromatography (VLC), gel chromatography and KLT preparative. Characterization of the fractions was established using UV-Vis and FTIR spectroscopy. Toxicity assay was conducted by *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) method. The LC_{50} of 7th to 11th fractions of the methanol extract were 107,86 ; 5,19; 136,42 ; 41,33 and 720,60 ppm, respectively. The 5th and 6th fractions were not toxic, the 11th fraction was toxic whereas other fractions were very toxic and potential to be used as an anticancer.

Keywords : *Cerbera odollam* Gaertn, BSLT, FT-IR, toxicity

ABSTRAK

Cerbera odollam Gaertn merupakan tanaman yang ditemukan di Indonesia yang digunakan sebagai obat. Telah dilakukan isolasi dan uji toksisitas dari daging buah tanaman ini. Isolasi metabolit sekunder dari bagian tanaman ini menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol. Pemisahannya dilakukan dengan kromatografi vakum cair (KVC), kromatografi gel, dan KLT preparatif. Karakterisasi dari hasil pemisahan menggunakan spektroskopi UV-Vis dan FT-IR. Uji Toksisitas dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). LC_{50} untuk fraksi 7 sampai dengan 11 dari ekstrak metanol berturut-turut adalah 107,86; 5,19; 136,42 ; 41,33 dan 720,60 ppm. Fraksi 5 dan 6 tidak toksik, fraksi 11 bersifat toksik sedangkan fraksi-fraksi lainnya bersifat sangat toksik dan berpotensi sebagai antikanker.

Kata kunci : *Cerbera odollam* Gaertn, BSLT, FT-IR, toksisitas

PENDAHULUAN

Cerbera odollam Gaertn (bintaro) merupakan salah satu spesies famili Apocynaceae yang digunakan dalam pengobatan herbal. Tumbuhan ini termasuk tumbuhan non-pangan, biasanya digunakan sebagai tanaman peneduh dan tanaman hias pada tepi jalan di perkotaan (Mardiasih, 2010). Penduduk lokal memanfaatkan jenis ini sebagai obat luka dengan mengiris halus daunnya, kemudian direndam di dalam minyak dan dioleskan pada bagian yang sakit. Di Brunei Darussalam, daunnya digunakan sebagai campuran perawatan pasca persalinan, sedangkan di India dan Thailand, kulit kayu, daun dan getahnya digunakan sebagai obat perangsang muntah dan cuci perut. Minyak bijinya bersifat racun dan dapat digunakan sebagai pencahar yang kuat (Khanh, 2001).

Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya diketahui senyawa kimia utama yang terdapat pada tumbuhan bintaro adalah sesqui-, sester-, trilignan dan saponin steroid (Murniana et al, 2011) Pemeriksaan fitokimia terakhir dari tumbuhan ini menghasilkan isolasi monoterpenoid, glikosida jantung, lignan, dan iridoid (Yu et al., 2009).

Berdasarkan hal tersebut di atas, maka peneliti tertarik untuk melakukan kajian lebih mendalam tentang tanaman ini, khususnya uji kualitatif kandungan senyawa, fraksinasi, isolasi dan uji toksisitas dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memperoleh senyawa yang teridentifikasi berdasarkan struktur serta memiliki aktivitas toksisitas.

METODE PENELITIAN

1. Prosedur Penelitian

a. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah seperangkat alat destilasi, neraca analitik, seperangkat alat *rotary evaporator* Heidolph 2000, *ultrasonicator* Kerry Pulsatron, lumpang, seperangkat alat kromatografi vakum cair, seperangkat alat kolom kromatografi, *chamber*, vial, pipa kapiler, lampu UV model UVL-56, spektrofotometer UV-Visible merk Hitachi U-2001, seperangkat alat HPLC (Shimadzu LC solution jenis kolom Shim-pack VP-ODS), spektrofotometer FT-IR merk Shimadzu type IR Prestige-21, pipet mikro, dan peralatan gelas yang biasa dipakai di laboratorium kimia.

Bahan yang digunakan adalah daging buah tanaman *Cerbera odollam*, metanol, *n*-heksana, etil asetat, DMSO, kloroform, FeCl₃ 01%, HCl pekat, H₂SO₄ pekat, reagen penampak noda Dragendroff, pereaksi Mayer, silika gel 60 GF₂₅₄ Merck, plat KLT GF₂₅₄ Merck, Sephadex-LH20, pereaksi Libermann-Burchard, logam Mg, plat KLT GF₂₅₄, benur *Artemia salina* Leach, air laut, aluminium foil dan akuades.

b. Penanganan Sampel

Buah bintaro sebanyak 7.000 g diambil dari kampus Universitas Riau Pekanbaru provinsi Riau. Buah langsung dihaluskan tanpa dilakukan proses pengeringan terlebih dahulu hingga diperoleh serbuk buah *C. odollam* kemudian siap untuk diekstraksi.

c. Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi, serbuk daging buah tanaman *C. odollam* direndam didalam bejana ekstraksi dengan pelarut metanol selama 1x24 jam pada suhu kamar, lalu diultrasonikasi dan disaring. Proses ekstraksi ini dilakukan lima kali dan ekstrak yang didapat diuapkan dari pelarutnya menggunakan alat *rotary evaporator* dan *freeze dryer*, sehingga didapat ekstrak total methanol.

Untuk memisahkan senyawa-senyawa yang ada dalam ekstrak metanol dilakukan fraksinasi dengan menggunakan kromatografi kolom vakum cair. Kromatografi kolom vakum cair (yang berdiameter 5 cm dan tinggi 20 cm) diisi dengan silika gel 60 GF₂₅₄ hingga mencapai ketinggian lebih kurang 8 cm. Pengisian kolom dilakukan dalam keadaan vakum, agar diperoleh kerapatan kemasan maksimum. Ekstrak metanol sebanyak 10 g dilakukan preadsorpsi dan dimasukkan ke dalam kolom. Selanjutnya dielusi secara bergradien menggunakan pelarut *n*-heksana, perbandingan *n*-heksana-etil asetat, sampai perbandingan etil asetat-metanol (1:1). Hasil pemisahan ditampung dalam erlenmeyer yang telah diberi nomor. kemudian dibiarkan hingga pelarutnya menguap.

Frakasi 8 hasil pemisahan secara kromatografi vakum cair dilakukan pemisahan dengan menggunakan kromatografi gel Sephadex LH-20. Kolom (yang berdiameter 1 cm dan tinggi 50 cm) diisi dengan Sephadex LH-20. Pengisian kolom dilakukan dengan cara mengalirkan pelarut. Fraksi 8 sebanyak 1,2080 g dimasukkan kedalam kolom, kemudian dielusi menggunakan eluen etil asetat-metanol (8:2). Hasil pemisahan ditampung dalam

vial yang telah ditimbang massanya dan telah diberi nomor, kemudian dibiarkan hingga pelarutnya menguap.

Dari hasil pengujian dengan menggunakan KCKT diketahui bahwa senyawa fraksi 8 tersebut masih kotor, ditandai dengan terdapatnya 3 puncak pada kromatogram KCKT selanjutnya dilakukan KLT preparatif untuk memisahkan pengotor agar didapat senyawa yang murni. Plat KLT (10 x 15 cm) diberikan batas atas dan bawah, masing-masing 1 cm dari atas dan bawah plat. Sampel dilarutkan dalam etil asetat-metanol (8:2). Larutan sampel diteteskan pada plat menggunakan pipet tetes dan dibiarkan mengering sebelum dielusi. Selanjutnya dielusi sampai pada batas atas plat yang telah ditandai, kemudian plat diangkat. Tandai noda yang dihasilkan dengan melihatnya dengan lampu UV. Senyawa yang akan diambil dikerok dan dilarutkan dalam pelarut metanol kemudian disaring dan dikeringkan.

2. Analisis Data

Analisis senyawa hasil pemisahan dengan KLT preparatif dilakukan dengan spektrofotometri UV, HPLC dan spektrofotometri FTIR.

3. Uji Toksisitas

Uji toksisitas tahap awal dilakukan pada ekstrak kental metanol daging buah bintaro dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Sebanyak 20 mg ekstrak kental metanol dilarutkan dalam 2 mL metanol, maka diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 10.000 ppm. Larutan ini dipipet sebanyak 0,5 mL ke dalam vial dan ditambahkan 4.5 mL metanol, maka diperoleh larutan dengan konsentrasi 1.000 ppm. Larutan ini

dipipet sebanyak 0,5 mL ke dalam vial dan ditambahkan 4.5 mL metanol, maka diperoleh larutan dengan konsentrasi 100 ppm. Larutan dengan konsentrasi yang berbeda tersebut, masing-masing dipipet sebanyak 0,5 mL, dimasukkan ke dalam vial uji dengan tiga kali pengulangan. Vial uji yang sudah berisi pelarut dibiarkan menguap, tambahkan 50 μ L DMSO dan air laut hingga mencapai batas kalibrasi. Larva udang dimasukkan ke dalam setiap vial uji sebanyak 10 ekor, tambahkan air laut sampai batas kalibrasi dan biarkan selama 24 jam, kemudian hitung larva yang mati. Data yang diperoleh digunakan untuk menghitung nilai LC_{50} .

Uji toksisitas juga dilakukan pada fraksi 5 (F_5) sampai dengan fraksi 11 (F_{11}) hasil kromatografi vakum cair dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), menggunakan larva udang laut *Artemia salina* Leach.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daging buah tanaman bintaro sebanyak 7.000 g. Ekstrak metanol yang diperoleh masih banyak mengandung air karena sampel tidak dilakukan kering-anginkan terlebih dahulu sebelum dimaserasi. Ekstrak metanol dikeringkan dengan menggunakan *freeze dryer*, ini bertujuan untuk membekukan larutan, menggranulasikan larutan yang beku tersebut, mengkondisikannya pada

vacum *ultra-high* dengan pemanasan yang sedang sehingga mengakibatkan air pada ekstrak tersebut akan menyublim dan akan menghasilkan produk padat. Ekstrak total metanol yang diperoleh sebanyak 48,9 g berwarna coklat tua. Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak total metanol memiliki kandungan metabolit sekunder golongan terpenoid dan saponin.

Ekstrak total metanol di lakukan uji toksisitas tahap awal dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), untuk mengetahui aktivitas toksisitas dari ekstrak daging buah *C. odollam* apakah memberikan aktivitas yang positif atau tidak. Uji BSLT ini menggunakan larva udang laut *A. salina* sebagai hewan uji, karena mudah didapat, murah, bisa disimpan beberapa tahun di tempat yang kering dan memiliki sensitivitas yang tinggi terhadap senyawa toksik.

Hasil uji toksisitas ekstrak total metanol diperoleh nilai LC_{50} 22,36 ppm, ini menunjukkan bahwa ekstrak total metanol bersifat sangat toksik. Serta adanya kemampuan ekstrak total metanol untuk membunuh 50% hewan uji (Tabel 1). karena suatu sampel dianggap toksik terhadap uji kematian larva udang jika konsentrasi maksimum 1.000 ppm dengan $LC_{50} \leq 500$ ppm (Zetra & Parasetya, 2007). Aktivitas toksisitas dari ekstrak total metanol diduga karena adanya senyawa aktif yang bersifat toksik.

Tabel 1: Hasil uji toksisitas ekstrak total metanol daging buah tanaman *C. odollam*

Ekstrak	Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva per vial	Jlh larva udang mati				% Kematian	Nilai probit	Log konsentrasi	LC_{50} (ppm)
			I	II	III	Jlh				
metanol	1000	10	9	10	9	28	93,33	6,476	3	22.36
	100	10	7	7	6	20	66,67	5,468	2	
	10	10	4	3	5	12	40	4,747	1	

Pemisahan pertama kali dilakukan dengan kromatografi vacum cair (KVC). Hasil pemisahan dengan kromatografi vakum cair diperoleh 11 fraksi. Fraksi 1 (F₁) tidak membawa senyawa kimia sehingga tidak dilakukan pengujian lebih lanjut. Fraksi 2 (F₂) sampai fraksi 7 (F₇) hanya berupa padatan yang sangat sedikit. Fraksi 8 (F₈) diperoleh berupa minyak berwarna kuning pucat sebanyak 1,2080 g. Fraksi 9 (F₉) sampai fraksi 11 (F₁₁) berupa padatan berwarna coklat yang masih sangat pekat. Uji toksisitas dilakukan pada F₅ sampai dengan F₁₁, ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas toksisitas dari masing-masing fraksi setelah dilakukan pemisahan. Hasil uji toksisitas menunjukkan bahwa F₅ dan F₆ bersifat tidak toksik dengan nilai LC₅₀ ≥1.000. Fraksi F₁₁ bersifat toksik dengan nilai LC₅₀ 720,60 sedangkan F₇ sampai dengan F₁₀ bersifat sangat toksik dengan nilai LC₅₀ berturut-turut adalah 107,86;

5,19; 136,42 dan 41,33 ppm (Tabel 2). Uji toksisitas tidak dilakukan pada F₁ sampai F₄ karena hanya berupa padatan yang jumlahnya sangat sedikit.

Fraksi 8 (F₈) dilanjutkan pemisahan dengan kromatografi gel Sephadex. Hasil pemisahan dengan kromatografi gel sephadex LH-20 diperoleh sebanyak 9 vial. Vial nomor 1 dan 2 serta vial 6 sampai 9 kosong sedangkan vial nomor 3 sampai 5 diperoleh minyak kuning pucat, maka dilakukan pengujian dengan KLT untuk melihat pola noda dari masing-masing vial. Vial nomor 3 dan 4 digabung karena memiliki nilai R_f yang sama dan menunjukkan pemisahan noda-noda yang hampir sama.

Vial nomor 3 dan 4 dilakukan pengujian dengan HPLC. Hasil kromatogram menunjukkan adanya 3 puncak pada panjang gelombang 240 dan 280 nm dengan waktu retensi 1,777

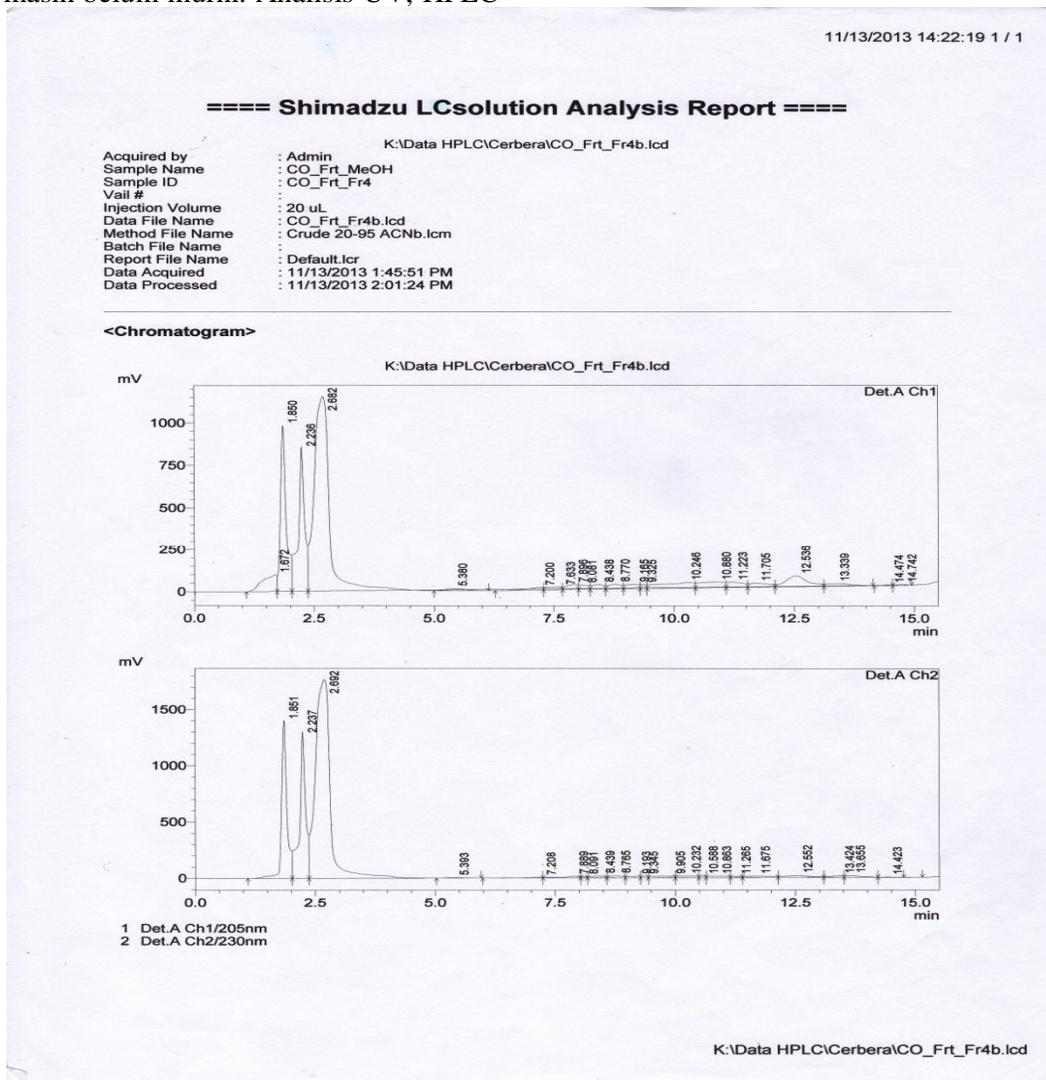
Tabel 2: Hasil uji toksisitas fraksi metanol hasil KVC daging buah *C. odollam*

Fraksi	Konsentrasi (ppm)	Jlh larva per vial	Jlh larva udang mati				%	Nilai probit	Log Konsentrasi	LC ₅₀ (ppm)
			I	II	III	Jlh				
F ₅	1000	10	6	6	4	16	53,33	5,075	3	≥1.000
	100	10	2	2	3	7	23,33	4,261	2	
	10	10	1	2	2	5	16,67	4,046	1	
F ₆	1000	10	5	4	5	14	46,67	4,950	3	≥1.000
	100	10	3	2	2	7	23,33	4,261	2	
	10	10	2	1	1	4	13,33	3,874	1	
F ₇	1000	10	7	8	9	24	80	5,842	3	107.86
	100	10	5	4	4	13	43,33	4,824	2	
	10	10	2	3	2	7	23,33	4,261	1	
F ₈	1000	10	10	10	9	29	96,66	6,881	3	5.19
	100	10	8	8	7	23	76,66	5,772	2	
	10	10	7	6	6	19	63,33	5,332	1	
F ₉	1000	10	10	9	9	28	93,33	6,476	3	136.42
	100	10	8	8	9	25	83,33	5,854	2	
	10	10	6	7	7	20	66,66	5,468	1	
F ₁₀	1000	10	9	7	8	24	80	5,842	3	41.33
	100	10	7	7	6	20	66,66	5,468	2	
	10	10	4	2	3	9	30	4,476	1	
F ₁₁	1000	10	5	6	6	17	56,67	5,182	3	720.60
	100	10	2	3	2	7	23,33	4,261	2	
	10	10	1	1	2	4	13,33	3,874	1	

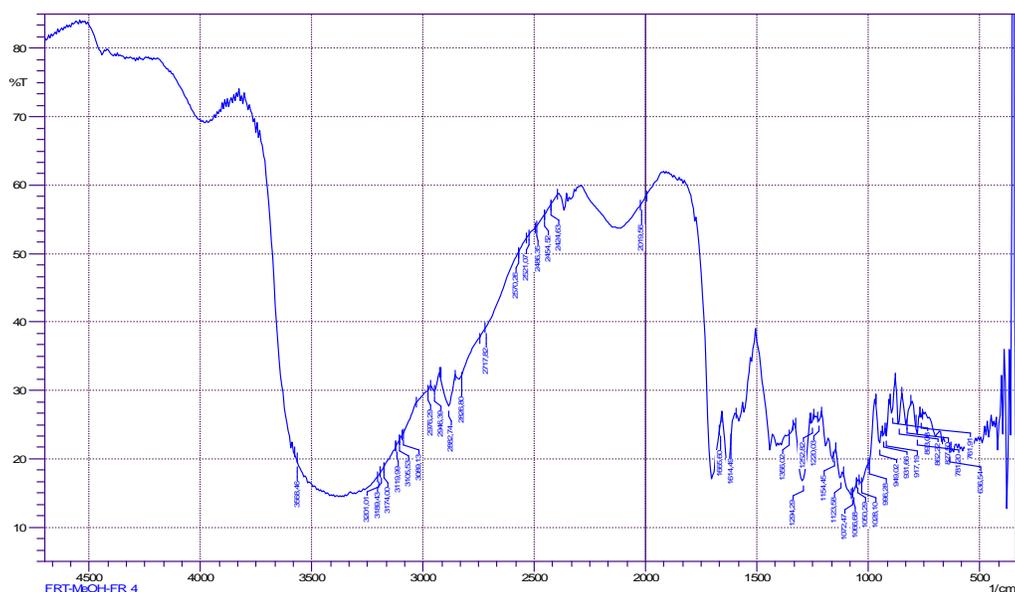
sampai 2,598 dengan sistem pelarut bertingkat 20% hingga 95% asetonitril. banyaknya puncak menunjukkan bahwa minyak tersebut masih belum murni. Hal ini mungkin disebabkan karena ukuran molekul dari senyawa tersebut hampir sama sehingga tidak dapat dilakukan pemisahan dengan kromatografi gel. Selanjutnya fraksi gabungan dilakukan KLT preparatif. Hasil pemisahan diperoleh sebanyak 3,2 mg. Hasil pemisahan dengan KLT preparatif juga masih belum murni. Analisis UV, HPLC

dan IR dilakukan terhadap fraksi hasil KLT preparatif.

Analisis HPLC menunjukkan bahwa F_{8.3-4} belum murni, ini dapat dilihat dengan adanya 3 puncak yang muncul pada kromatogram (Gambar 1). Puncak-puncak yang muncul pada kromatogram memiliki jarak yang sangat dekat (berdempet), Hal ini mungkin disebabkan karena senyawa tersebut merupakan isomer sehingga sangat sulit untuk dimurnikan.



Gambar 1. Hasil analisis HPLC fraksi hasil KLT preparatif



Gambar 2. Hasil analisis IR fraksi hasil KLT preparatif dari ekstrak methanol

Analisis FTIR dapat memperkirakan gugus fungsi apa saja yang terkandung dalam $F_{8,3-4}$ dengan melihat spektrumnya, karena spektrum inframerah senyawa organik bersifat khas, artinya senyawa yang berbeda akan mempunyai spektrum yang berbeda pula. Hasil analisis FTIR menunjukkan adanya pita serapan C-O pada bilangan gelombang 1.294 cm^{-1} , pita serapan C=O pada bilangan gelombang 1.665 cm^{-1} dan pita serapan O-H pada bilangan gelombang 3.201 cm^{-1} .

Struktur senyawa yang terkandung dalam $F_{8,3-4}$ tidak dapat diketahui, karena jumlah sampel yang sangat sedikit, sehingga tidak bisa dilakukan analisis lebih lanjut.

KESIMPULAN

Hasil identifikasi dengan FTIR dapat dinyatakan bahwa senyawa yang terkandung dalam ekstrak daging buah tanaman bintangro (*Cerbera odollam* Gaertn) memiliki gugus fungsi C-O, C=O dan O-H. Uji toksisitas dengan

metoda BSLT terhadap ekstrak kental metanol, fraksi F_7 sampai F_{10} bersifat sangat toksik. Uji toksisitas fraksi F_{11} terhadap kematian larva udang menunjukkan bahwa fraksi ini bersifat toksik. Sedangkan Fraksi F_5 dan F_6 bersifat tidak toksik.

UCAPAN TERIMAKASIH

Kepada Bapak Dr. Hilwan Yuda Teruna, M.Sc, Apt yang banyak memberikan saran dan perbaikan selama berdiskusi dengan beliau dan Bapak Prof. Dr. Jasril, MS yang banyak memberikan saran dan bantuan moril sehingga penelitian ini dapat diselesaikan. Selain itu, penulis juga mengucapkan terimakasih kepada Ibu Dr. Nurhayati, M.Sc yang banyak memberikan saran dan masukan demi kesempurnaan penulisan karya ilmiah ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Khanh, T. C. 2001. *Cerbera* L. dalam : van Valkenburg, J.L.C.H., dan Bunyapraphatsara, N. (Editor): *Plant Resources of South-East Asia No. 12 (2) Medicinal and Poisonous Plants*. Backhuys Publisher, Leiden, the Netherlands. Pp. 151-155.
- Mardiasih, WP. 2010. *Aktivitas Insektisida dan Penghambat Peneluran Ekstrak Cerbera Odollam dan Cymbopogon citratus Terhadap Lalat Buah Bactrocera carambolae Pada Belimbing*. Sekolah Pascasarjana ITB, Bogor.
- Murniana., Oesman, F., Bahri, S., Septa, DL. dan Saidi, N. 2011. Antifungal Activity from Seed of *Cerbera odollam* Against *Candida albicans*. *Jurnal Natural*. 11: 1.
- Yu, X., Xu, MJ., Deng, ZW., dan Lin, WH. 2009. A new Linear Monoterpene from the Chinese Mangrove Plant *Cerbera manghas* L. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*. Vol. 18: 232-235.
- Zetra, Y., & Parasetya, P. (2007). Isolasi Senyawa α -Amirin dari Tumbuhan *Beilschmiedia roxburghiana* (Medang) dan Uji Bioaktivitasnya. *Akta Kimindo*, 3, 27-32.