

UJI POTENSI AKTIVITAS ANTI KANKER EKSTRAK DAUN PANDAN WANGI (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) DENGAN METODE BRINE SHRIMP LETHALITY TEST (BSLT)

Dede Sukandar, Sandra Hermanto, dan Emi Lestari

Program Studi Kimia Jurusan MIPA Fakultas Sains dan Teknologi UIN Syarif Hidayatullah Jakarta,
Jalan Ir. H. Juanda No 95 Ciputat 15412 Indonesia
Telp. (62-21) 7493606, Email: ds_tea2007@yahoo.com

INTISARI

Telah dilakukan penelitian untuk mengetahui potensi aktivitas antikanker dari ekstrak daun pandan wangi menggunakan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Ekstrak dibuat dengan cara maserasi menggunakan tiga macam pelarut, yaitu butanol, etil asetat, dan petroleum eter. Uji toksisitas dilakukan dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach yang berumur 48 jam. Efek toksik masing-masing ekstrak diidentifikasi dengan presentase kematian larva udang menggunakan analisis probit (LC_{50}). Ekstrak aktif kemudian diuji kandungan fitokimianya dan senyawa bioaktif yang disarankan menggunakan GC-MS. Hasilnya menunjukkan ekstrak etil asetat bersifat toksik (LC_{50} : 288,4 ppm). Senyawa yang terkandung dalam ekstrak etil asetat yang diduga toksik adalah senyawa terpenoid dan steroid.

Kata kunci : Ekstrak Daun Pandan Wangi, BSLT, *Artemia salina* Leach, Fitokimia, dan GC-MS

ABSTRACT

Has been done research to know anticancer potencial activity from fragrant screw pine leaf extract applies method Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Extract is made by the way of macerate to apply three kinds of solvent, that is butanol, ethyl acetate, and ether petroleum. Toxicity test is done by using prawn larva *Artemia salina* Leach which age 48 hours. Toxic effect each extract is identified with presentase death of prawn

larva applies probit analysis (LC_{50}). Active extract then is tested its the phytochemistry content and compound bioaktif suggested applies GC-MS. Result of his(its showing ethyl acetate extract to have the character of toxic (LC_{50} : 288,4 ppm). The toxic compounds which prediction implied in ethyl acetate extract is terpenoids and steroid

Keywords : Fragrant Screw Pine Leaf Extract, BSLT, *Artemia salina* LFitokimia, and GC-MS

PENDAHULUAN

Bahan-bahan hayati telah digunakan oleh manusia untuk memenuhi berbagai keperluan hidup. Indonesia yang beriklim tropis memiliki sumber daya alam hayati yang sangat beranekaragam. Tumbuh-tumbuhan hutan tropik Indonesia memiliki peranan dalam era teknologi yang tidak kalah penting dengan sumber daya alam lainnya seperti gas, batu bara, mineral, dan lain-lain.

Dari segi kimia, sumber daya alam hayati ini merupakan sumber senyawa kimia yang tak terbatas jenis maupun jumlahnya. Dengan demikian keanekaragaman hayati dapat diartikan sebagai keanekaragaman kimiawi yang mampu menghasilkan bahan-bahan kimia, baik untuk kebutuhan manusia maupun organisme lain seperti untuk obat-obatan, insektisida, kosmetika,

dan sebagai bahan dasar sintesa senyawa organik yang lebih bermanfaat (Achmad, 1986).

Pengobatan secara tradisional sebagian besar menggunakan ramuan yang berasal dari tumbuh-tumbuhan baik berupa akar, kulit batang, kayu, daun, bunga, atau bijinya. Agar pengobatan secara tradisional dapat dipertanggungjawabkan maka diperlukan penelitian ilmiah seperti penelitian di bidang farmakologi, toksikologi, identifikasi, dan isolasi zat kimia aktif yang terdapat dalam tumbuhan.

Salah satu tumbuhan yang banyak digunakan sebagai obat tradisional adalah pandan wangi, dengan nama ilmiah *Pandanus amaryllifolius* Roxb, termasuk genus *pandanus* dari suku *Pandanaceae*. Daun pandan wangi sering digunakan sebagai bahan penyedap, pewangi, dan pemberi warna hijau pada masakan. Selain itu juga berkhasiat untuk menghitamkan rambut, menghilangkan ketombe, rambut rontok, lemah saraf, tidak nafsu makan, rematik, sakit disertai gelisah, serta pegal linu (Dalimartha, 2002).

Daun pandan wangi mengandung alkaloid, saponin, flavonoida, tanin, polifenol, dan zat warna (Sugati dan Jhonny, 1991). Komposisi utama yang menyebabkan aroma pada pandan wangi tidak diketahui dengan pasti. Kemungkinan senyawa utama penyusun aroma pada daun pandan wangi adalah 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) (Buttery, 1983)

Sebuah penelitian (Sukandar, 2007) melaporkan tumbuhan pandan wangi memiliki beberapa senyawa kimia yang menjadi komponen penyusun minyak atsiri daun pandan wangi (*P. amaryllifolius* Roxb.) yaitu : 3-alil 6-metoksi fenol, 3-metil 2 (5H) furanon, dietil ester 1,2-benzenadikarboksilat, dan 1,2,3-propanetril ester asam dodekanoat.

Pada uji pendahuluan senyawa aktif pada

ekstrak tanaman biasanya digunakan hewan uji. Salah satu hewan uji yang sesuai adalah brine shrimp (udang laut) *A. salina* Leach, sejenis udang-udangan primitif dan pertama kali ditemukan di Lymington, Inggris pada tahun 1755 dan termasuk famili *crustaceae* tingkat rendah dari phylum *arthropoda* (Purwakusuma, 2007).

Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) pertama kali diperkenalkan oleh Michael, dkk pada tahun 1956. Metode pengujian ini didasarkan pada bahan senyawa aktif dari tumbuhan yang bersifat toksik dan mampu membunuh larva *A. salina* Leach. dan dapat digunakan sebagai uji praskrining aktivitas antikanker (Meyer et al, 1982).

Berdasarkan hal tersebut maka penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui potensi aktivitas antikanker melalui uji toksisitas ekstrak pandan wangi terhadap larva udang *A. salina* Leach melalui uji toksisitas ekstrak pandan wangi terhadap larva udang *A. salina* Leach melalui uji.

METODA PENELITIAN

Umum. Penguapan pelarut menggunakan rotary evaporator Buchi dan kromatografi dilakukan dengan alat GCMS 6890 N-5973 Agilent.

Bahan Tumbuhan dan larva *Artemia salina* Leach. Sampel daun pandan wangi (*P. amaryllifolius* Roxb.) dikumpulkan pada bulan Juni 2007 dari Kelurahan Beji Timur, Kecamatan Beji, Depok. Identitas biologi tumbuhan tersebut ditentukan oleh ahli botani Herbarium Bogoriense, Cibinong dan spesimennya disimpan di herbarium tersebut. Sedangkan larva *A. salina* Leach berasal dari Laboratorium Kimia LIPI, Serpong.



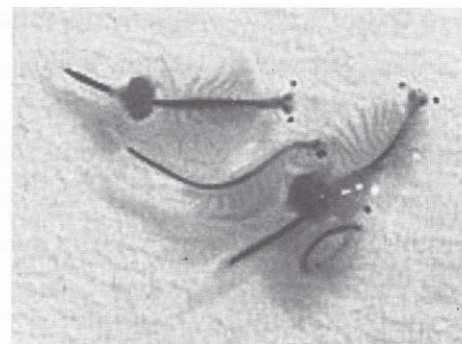
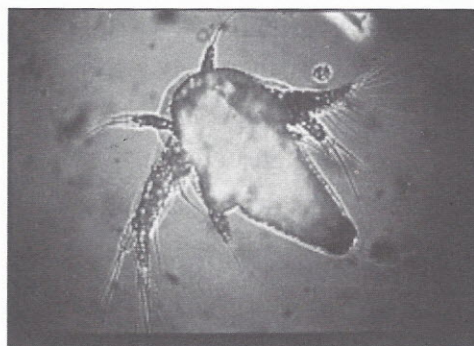
Gambar 1. Tumbuhan Pandan Wangi

Ekstraksi. Sebanyak 25 g daun pandan wangi yang telah dikeringkan dan dihaluskan, dimaserasi dengan butanol, etil asetat, dan petroleum eter kualitas teknis (3 x 24 jam). Setelah dilakukan penyaringan masing-masing ekstrak dipisahkan pada suhu 40–65 °C hingga diperoleh padatan gum berwarna hijau (ekstrak butanol 2,43 g, etil asetat 1,71 g, dan petroleum eter 0,66 g). Ketiga ekstrak kemudian diuji toksisitasnya dengan metode BSLT.

Uji Toksisitas. Sebanyak 4 mg ekstrak sampel dilarutkan dalam 10 µL Dimetil Sulfoksida (DMSO) 10 ppm dan ditambah pelarut air laut sampai 2 ml (2000 ppm) sebagai larutan A. Larutan A 8 mL dipipet dan ditambahkan pelarut sampai 10 mL (1600 ppm) sebagai larutan B. Larutan B 5 mL dipipet dan ditambahkan pelarut sampai 10 mL (800 ppm) sebagai larutan C. Larutan C 5 mL dipipet dan ditambahkan pelarut sampai 10 mL (400 ppm) sebagai larutan D. Larutan D 5 mL dipipet dan ditambahkan pelarut sampai 10 mL (200 ppm) sebagai larutan E. Selanjutnya, dari

larutan A, B, C, D, E masing-masing dipipet sebanyak 100 µL lalu dimasukkan ke dalam microplate yang sudah ditara 200 µL. Setiap konsentrasi dibuat tiga kali pengulangan.

Ke dalam microplate yang berisi ekstrak dimasukkan 10 ekor larva *A. Salina* Leach yang berumur 48 jam. Sebagai kontrol, digunakan 10 ekor larva *A. Salina* Leach di dalam 200 µL air laut tanpa diberi ekstrak. Campuran dibiarkan selama 24 jam di bawah cahaya lampu neon 18 watt. Setelah 24 jam, larva udang yang mati dari masing-masing wadah dihitung dan nilai LC_{50} nya ditentukan menggunakan analisis probit. Ekstrak yang memiliki potensi aktivitas antikanker (toksisitas) tertinggi kemudian diuji kandungan fitokimianya.



Gambar 2. Larva Udang dan Udang *Artemia Salina* Leach

Skrining Fitokimia. Skrining fitokimia bertujuan mengetahui kandungan alkaloid, flavonoid, steroid, terpenoid, dan saponin dalam ekstrak etil asetat daun pandan wangi, yang mempunyai efek biologi menghambat pertumbuhan kanker, mikroba, sebagai

antioksidan, menurunkan kolesterol darah, dan kadar glukosa darah, bersifat antibiotik, serta menimbulkan efek peningkatan kekebalan (Sumastuti, 2002). Identifikasi Flavonoid dilakukan dengan cara menambahkan serbuk Mg dan 2 ml HCl 2N pada 2 mL larutan ekstrak. Senyawa flavonoid akan menunjukkan warna jingga sampai merah. Identifikasi Alkaloid dilakukan dengan cara 3 ml larutan ekstrak ditambahkan dengan 1 ml HCl 2N dan 6 ml air suling, kemudian dipanaskan selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat diperiksa dengan pereaksi Dragendorff terbentuk endapan jingga, Wagner terbentuk endapan coklat, dan Mayer terbentuk endapan putih. Identifikasi Steroid dan Terpenoid dilakukan dengan cara sebanyak 1 ml larutan ekstrak diuapkan sampai kering, kemudian ditambah dengan pereaksi Lieberman-Burchard. Warna biru atau hijau menunjukkan steroid sedangkan warna merah menunjukkan terpenoid. Identifikasi Saponin dilakukan dengan cara ekstrak ditambahkan metanol lalu dipanaskan selama beberapa menit. Kemudian dikocok vertikal selama 10 detik. Hasil uji positif jika timbul busa stabil selama beberapa menit (Harborne, 1987).

Identifikasi GC-MS. Ekstrak etil asetat yang memiliki toksisitas tertinggi diidentifikasi kandungan senyawanya menggunakan GC-MS 6890 N-5973 Agilent dengan kondisi kolom (HP-5, 0.25 mm * 30 m * 0.25 µm), suhu oven (50°C - 290°C), Interface (290 °C), kontrol mode (split), tekanan (20.8 psi), total flow (23.7 ml/min), split ratio : (200 : 1), split flow (199 ml/min), gas (He), gas saver (ON), dan detector (MSD).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Potensi aktivitas antikanker dilakukan melalui uji toksisitas dengan Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) merupakan praskrining terhadap senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak tanaman. Hasil uji potensi aktivitas

antikanker ini dapat diketahui dari jumlah kematian larva udang *A. salina* Leach karena pengaruh ekstrak atau senyawa bahan alam dari dosis yang telah ditentukan.

Suatu ekstrak dianggap berpotensi antikanker apabila memiliki toksisitas dengan nilai $LC_{50} < 1000$ ppm sedangkan untuk senyawa murni dikatakan berpotensi antikanker apabila memiliki nilai toksisitas LC_{50} nya < 200 ppm (Meyer, dkk. 1982). Hasil uji potensi aktivitas antikanker ekstrak butanol, etil asetat, dan petroleum eter daun pandan wangi dengan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) tertera pada tabel di bawah ini.

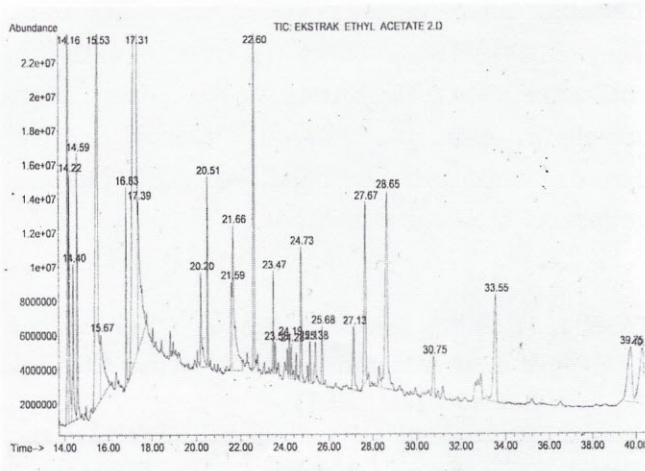
Tabel 1. Hasil Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pandan Wangi dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)

Ekstrak	Konsentrasi (ppm)	Mortalitas (%)	LC_{50} (ppm)	Keterangan
Butanol	800	25,71	8.511,38	Tidak toksik
	400	8,47		
	200	3,49		
	100	0		
Etil asetat	800	92,42	288,4	Toksik
	400	64,81		
	200	36		
	100	1,61		
Petroleum eter	800	11,76	912.010,84	Tidak toksik
	400	6,25		
	200	3,29		
	100	0		
Kontrol	0	0	0,00	-

Diantara ketiga ekstrak yang diuji, ekstrak etil asetat mempunyai LC_{50} sebesar 288,4 ppm atau kurang dari 1000 ppm. Hal ini berarti ekstrak etil asetat bersifat toksik terhadap udang *A. salina* Leach, sekaligus berpotensi sebagai antikanker. Hasil kontrol dengan air laut (mortalitas 0 %), menunjukkan bahwa larva yang mati disebabkan senyawa toksik pada ekstrak, bukan karena faktor lainnya.

Hasil skrining fitokimia menunjukkan adanya senyawa steroid (+), sedangkan senyawa terpenoid, alkaloid, flavonoid, dan saponin tidak terdapat (-) dalam ekstrak etil asetat.

Hasil analisa kromatografi GC-MS terhadap ekstrak etil asetat daun pandan wangi dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 3. Hasil Analisa Kromatografi GC-MS Ekstrak Etil Asetat

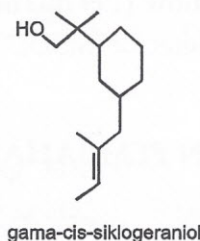
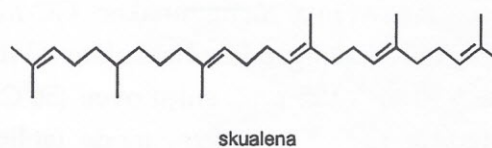
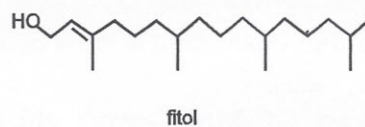
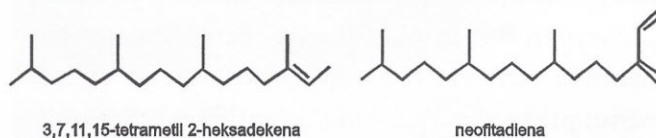
Beberapa senyawa yang terkandung dalam ekstrak etil asetat berdasarkan analisa GC-MS terangkum dalam tabel 3.

Tabel 2. Perkiraan Senyawa yang terkandung dalam Ekstrak Etil Asetat Daun Pandan Wangi

Puncak	Waktu retensi (Rt)	Luas Puncak	Kemiripan (%)	Kemungkinan Nama Senyawa
5	15,53	12,78	98	Neofitadiena
9 dan 10	17,39 dan 17,52	3,08 dan 0,46	70 dan 95	Metil Linolenat
11	17,56	1,03	96	Asam 9,12-oktadekadienoat
19	24,19	0,53	94	Gama. -cis-seksisiklogeraniol
21	24,73	1,81	98	3,5-dediidro
22 dan 26	25,14 dan 27,67	0,52 dan 3,62	25 dan 95	stigmastan-6,22-dien Stigmastan-3,5-dien
24	25,68	0,76	96	Kampesterol
25	27,13	1,36	96	Stigmastan-5,22-dien-3-ol,
27	28,65	6,06	96	Gama. -sitosterol
28	30,75	0,89	97	Neofitadiena

Berdasarkan data diatas terdapat 4 golongan senyawa utama yang terkandung dalam ekstrak etil asetat, yaitu asam lemak (lemak), terpenoid, steroid, dan vitamin.

Diantara senyawa-senyawa tersebut yang diduga bersifat toksik terhadap udang *A. salina* Leach adalah senyawa terpenoid dan steroid. Hal ini didasarkan pada laporan Indriyani, dkk. (2006) yang menyatakan bahwa ekstrak daun pecut kuda bersifat toksik terhadap larva *A. salina* Leach dan senyawa yang terkandung di dalamnya adalah senyawa terpenoid. Selain itu, senyawa terpenoid dikenal pula sebagai salah satu golongan senyawa kimia dalam tanaman yang memiliki aktivitas antikanker dan antioksidan (Lisdawati, 2002).

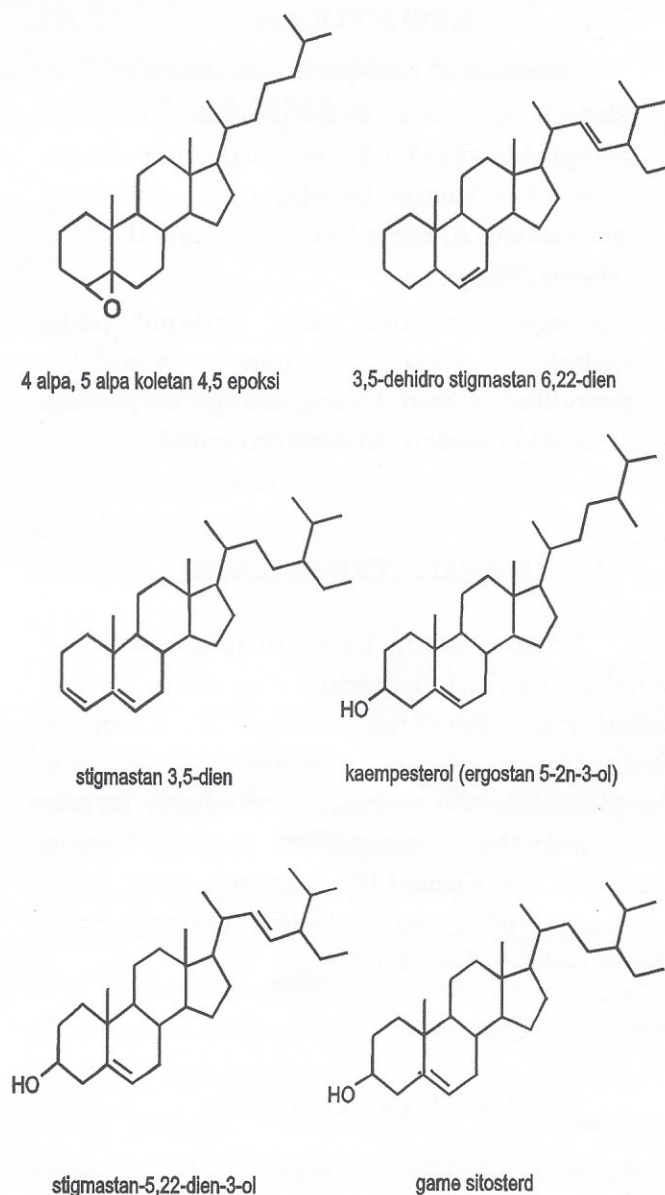


Gambar 4. Beberapa Senyawa Terpenoid dalam Ekstrak Etil Asetat Daun Pandan Wangi

Senyawa terpenoid yang terdapat dalam ekstrak etil asetat meliputi neofitadiena, 3,7,11,15- tetrametil 2-heksadekena, fitol, skualena, dan gamma.-cis-seskuisiklogeraniol. Berdasarkan analisa GC-MS, salah satu senyawa terpenoid yang diduga bersifat toksik terhadap udang *A. salina* Leach. yang memiliki waktu retensi 22,61, kualitas 98 % dan luas puncak 6,40 % adalah *skualena*. Senyawa ini bermasa molekul relatif (m/z) 409 (M+1 = 410) dengan rumus molekul $C_{30}H_{49}$.

Selanjutnya berdasarkan hasil penelitian Sukardiman (2004) senyawa steroid pada ekstrak metanol *Marchantia planiloba* Steph. mampu membunuh larva *A. salina* Leach dengan LC_{50} $247,10 \pm 5,28 \mu\text{g/ml}$. Fitosterol yang juga dikenal sebagai sterol tumbuhan seperti stigmasterol, kampesterol, sitosterol, ergotamin (provitamin D) memiliki kemampuan untuk berkompetisi dengan kolesterol dalam penyerapannya di dalam usus. Kompetisi ini mengakibatkan berkurangnya jumlah kolesterol yang dapat diserap oleh tubuh (Ostlund, dkk. 2003). Selain itu, sterol juga dapat berperan dalam mencegah terjadinya kanker (De Stefani, dkk. 2000).

Senyawa steroid yang terdapat dalam ekstrak etil asetat antara lain solanesol, 4α , 5α -kolestan 4,5-epoksi, 3,5-dedihidro stigmastan - 6,22-dien, stigmastan-3,5-dien, kampesterol, stigmastan- 5,22-dien-3-ol, dan gamma.-sitosterol.



Gambar 5. Beberapa Senyawa Steroid dalam Ekstrak Etil Asetat Daun Pandan Wangi

Hasil analisa GC-MS dari ekstrak etil asetat yang bersifat toksik terhadap udang *A. salina* juga menunjukkan adanya salah satu senyawa steroid yang berada pada waktu retensi 28,65, luas puncak 6,06 %, dan kualitas 96 % adalah senyawa *gamma-sitosterol*. Senyawa ini memiliki massa molekul realif (m/z) 414 ($M^+ = 414$) sesuai dengan rumus molekul $C_{29}H_{50}O$.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, yaitu :

1. Ekstrak etil asetat daun pandan wangi (*P. amaryllifolius* Roxb.) diduga berpotensi sebagai antikanker karena bersifat toksik terhadap larva udang *A. salina* Leach. dengan nilai LC₅₀ sebesar 288,4 ppm.
2. Golongan senyawa yang terdapat pada ekstrak etil asetat daun pandan wangi (*P. amaryllifolius* Roxb.) yang diduga berpotensi antikanker adalah senyawa terpenoid.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami ucapkan kepada pimpinan dan staf Herbarium Bogoriense Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Cibinong Jawa Barat, yang telah membantu mengidentifikasi spesimen tumbuhan. Terima kasih pula kami sampaikan kepada Kepala Laboratorium Kimia-LIPI Serpong, yang telah membantu pengujian toksitas dengan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT).

DAFTAR PUSTAKA

1. Achmad. S.A, 1986. *Kimia Organik Bahan Alam*. Universitas Terbuka, Jakarta.
2. Buttery, R. G., Ling, L. C., Juliano, B. O. and Turnbaugh, J. C., *Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline*. J.Agric. Food Chem., 1983, 31, 823-826.
3. Dalimartha, Setiawan. 2002. *Obat Tradisional, Pandan wangi (Pandanus amaryllifolius Roxb.)*. <http://www.pdpersi.co.id>. 13 April 2007.
4. De Stefani, Eduardo, et al. 2000. *Plant Sterols and Risk of Stomach Cancer: A Case-Control Study in Uruguay*. Nutrition and Cancer 37 (2): 140-144.
5. Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, Terbitan Kedua*. ITB, Bandung.
6. Indrayani, Lany, Hartati Soetjipto dan Lydia Sihasale. 2006. *Skrining Fitokimia dan Uji*

- Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (Stachytarpheta jamaicensis L. Vahl) Terhadap Larva Udang Artemia salina Leach*. Berk. Penel. Hayati: 12 (57-61)
7. Lisdawati, Vivi. 2002. *Buah Mahkota Dewa (Phaleria macrocarpa): Toksisitas, Efek Antioksidan dan Efek Antikanker Berdasarkan Uji Penapisan Farmakologi*. <http://mahkotadewa.com/VFC/vivi.htm>. 17 September, 2007.
8. Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J.E., Jacobson, L. B., Nichols, D. E., and McLaughlin, J. L. 1982. *Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents*. Planta Medica, 45:31-34.
9. Ostlund RE, Racette, SB, and Stenson WF .2003. *Inhibition of cholesterol absorption by phytosterol-replete wheat germ compared with phytosterol-depleted wheat germ*. Am J Clin Nutr 77 (6): 1385-1589.
10. Purwakusuma, Wahyu. 2007. *Artemia salina (Brine Shrimp)*. <http://www.o-fish.com/PakanIkan/artemia.php>. 30 Oktober 2007.
11. Sugati, S. dan Johnny, R.H. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*. Badan Penelitian & Pengembangan Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
12. Sukandar, Dede. 2007. *Isolasi dan Penentuan senyawa kimia minyak atsiri tumbuhan pandan wangi (P. amaryllifolius Roxb.)*. 42 : 53
13. Sukardiman, Abdul Rahman, dan Nadia Fatma Pratiwi. 2004. *Uji Praskrining Aktivitas Antikanker Ekstrak Eter dan Ekstrak Metanol Marchantia cf. planiloba Steph. Dengan Metode Uji Kematian Larva Udang dan Profil Densitometri Ekstrak Aktif*. Majalah Farmasi Airlangga Vol.4 No 3
14. Sumastuti, R., Sonlinar, M. 2002. *Efek Sitotoksik Ekstrak Buah dan Daun Mahkota Dewa [Phaleria macrocarpa (Scheff) Boerl.] Terhadap Sel Hela*. Farmakologi Fakultas Kedokteran UGM, Yogyakarta.