

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

Rissan Ramaesy Tobing, Hilwan Yuda Teruna, Yuharmen

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

ABSTRACT

Cerbera odollam Gaertn is a plant found in Indonesia and used as a medicine. Isolation of its secondary metabolites and toxicity assay on leaves of this plant have been done by macerating method with methanol solvent. The separation was carried out by vacuum liquid chromatography (VLC) and column chromatography, respectively. Characterization of the fractions was established using UV-Vis, FT-IR, and NMR. Toxicity assay was conducted by *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) method. The LC₅₀ of 2th, 4th to 11th fractions of the methanol extract were 874.78; 1076.71; 7.88; 0.85; 3.02; 0.23; 8.62; 3.94; 223.46; and 168.23 ppm respectively. The 3th fraction was not toxic, where as other fractions were toxic and potential as anticancer.

Keywords: *Cerbera odollam*, BSLT, toxicity

ABSTRAK

Cerbera odollam Gaertn merupakan tanaman yang ditemukan di Indonesia yang digunakan sebagai obat. Telah dilakukan isolasi metabolit sekunder dan uji toksisitas dari daun tanaman ini menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol. Pemisahannya dilakukan dengan kromatografi vakum cair (KVC) dan kromatografi kolom. Karakterisasi dari hasil pemisahan menggunakan spektrofotometri UV-Vis, FT-IR, NMR dan uji toksisitas dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Hasilnya diperoleh senyawa amorf berwarna putih. Nilai LC₅₀ untuk fraksi 2 sampai dengan 11 dari ekstrak metanol berturut-turut adalah 874,78; 1076,71; 7,88; 0,85; 3,02; 0,23; 8,62; 3,94; 223,46; and 168,23 ppm. Fraksi 3 tidak toksik, sedangkan fraksi-fraksi lainnya bersifat toksik dan berpotensi sebagai antikanker.

Kata kunci : *Cerbera odollam*, BSLT, toksisitas

PENDAHULUAN

Cerbera odollam Gaertn (bintaro) merupakan salah satu spesies dari tumbuhan famili Apocynaceae yang digunakan dalam pengobatan tradisional. Tumbuhan ini mengandung racun serberin yang bersifat menghambat saluran ion kalsium dari dalam otot jantung manusia, sehingga mengganggu kerja jantung dan dapat mengakibatkan kematian (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 (Windadri, 2003). Di Thailand, biji *C. odollam* dimanfaatkan sebagai antipiretik dan obat dysuria. Minyak dari bijinya digunakan sebagai obat scabies dan *hair tonic*. Sedangkan di Vietnam, minyak dari bijinya dimanfaatkan sebagai pembunuh kutu rambut. Daunnya digunakan sebagai obat haemorrhoids (PROSEA, 2002).

Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya diketahui senyawa kimia utama yang terdapat pada tumbuhan bintaro adalah steroid dan terpenoid (Murniana *et al.*, 2011). Pemeriksaan fitokimia terakhir dari tumbuhan ini menghasilkan isolasi monoterpenoid, triterpenoid, flavonoid, glikosida jantung, dan lignan (Yu *et al.*, 2009).

Berdasarkan hal tersebut di atas, telah dilakukan 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 Genesys 10S, seperangkat alat HPLC (Shimadzu LC solution jenis kolom Shim-pack VP-ODS), spektrofotometer FT-IR merk Shimadzu type IR Prestige-21, spektroskopi NMR (Agilent dengan medan magnet 500 MHz untuk proton), pipet mikro, dan peralatan gelas yang biasa dipakai di laboratorium kimia.

Bahan yang digunakan adalah daun 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, pereaksi Libermann-Burchard, logam Mg, benur *Artemia salina* Leach, air laut, alumunium foil dan akuades.

b. Penanganan Sampel

Daun bintaro dengan berat basah sebanyak 7 kg diambil dari kampus Universitas Riau Pekanbaru provinsi Riau. Daun dikering anginkan terlebih dahulu, dan dijaga agar tidak terkena sinar matahari secara langsung sampai beratnya konstan, setelah kering dihaluskan hingga diperoleh serbuk kering. Daun *C. odollam* siap untuk diekstraksi.

c. Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi, serbuk daun tanaman *C. odollam* direndam didalam bejana ekstraksi dengan pelarut metanol dan *n*-heksana secara beurut selama 1x24 jam pada suhu kamar, lalu diultrasonikasi dan disaring. Proses ekstraksi ini dilakukan tiga kali menggunakan pelarut *n*-heksana dan empat kali menggunakan pelarut metanol. Ekstrak yang didapat diuapkan dari pelarutnya menggunakan alat *rotary evaporator*, sehingga didapat ekstrak total *n*-heksana dan 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.

Fraksi 7 hasil pemisahan secara kromatografi vakum cair dilakukan pemisahan dengan menggunakan kromatografi kolom (yang berdiameter 2 cm) diisi dengan silika gel 60 GF₂₅₄. Pengisian kolom dilakukan dengan cara mengalirkan pelarut. Fraksi 7 sebanyak 0,6399 g dimasukkan kedalam kolom, kemudian dielusi menggunakan eluen *n*-heksana-etil asetat (1:1) sampai

etilasetat-metanol (1:1). 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 V₃₄ tersebut masih kotor, ditandai banyaknya puncak pada kromatogram KCKT.

2. Analisis Data

Analisis senyawa hasil pemisahan dengan kromatografi kolom dilakukan dengan spektrofotometri UV, HPLC, spektrofotometri FTIR dan spektrofotometer NMR yaitu spektrum ¹H-NMR

3. Uji Toksisitas

Uji toksisitas tahap awal dilakukan pada ekstrak kental *n*-heksana dan metanol daging buah bintaro dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Kemudian dari masing-masing ekstrak *n*-heksana dan metanol sebanyak 20 mg 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 µL 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 LC₅₀.

Uji toksisitas juga dilakukan pada fraksi 2 (F₂) sampai dengan fraksi 11 (F₁₁) 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 daun tanaman bintaro sebanyak 7 kg berat basah. Maserat yang diperoleh disaring dengan kapas, kemudian digabungkan dan pelarutnya diuapkan dengan alat *rotary evaporator*. Ekstrak total metanol yang diperoleh sebanyak 92,3 gram berwarna hijau pekat sedangkan ekstrak *n*-heksana yang diperoleh berwarna hijau tua sebanyak 88,7 gram.

Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak total metanol memiliki kandungan metabolit sekunder golongan steroid, flavonoid dan saponin. Ekstrak total metanol di lakukan uji toksisitas tahap awal dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), untuk mengetahui aktivitas toksisitas dari

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 *n*-heksana dan metanol diperoleh nilai LC₅₀ 11,50 dan 9,33 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 LC₅₀ ≤ 500 ppm (Zetra & Parasetya, 2007). Aktivitas toksisitas dari ekstrak total metanol diduga karena adanya senyawa aktif yang bersifat toksik. Pemisahan pertama kali dilakukan dengan kromatografi vakum cair (KVC). Hasil pemisahan dengan kromatografi vakum cair diperoleh 11 fraksi. Fraksi 1 (F₁) tidak ada membawa senyawa kimia, sehingga tidak dilakukan pengujian lebih lanjut Fraksi 2 (F₂) sampai fraksi 6 (F₇) hanya berupa padatan yang sangat sedikit. Fraksi 7 (F₇) diperoleh berupa kristal amorf berwarna putih kekuningan

Tabel 1: Hasil uji toksisitas ekstrak total metanol daun 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				
<i>n</i> -heksana	1000	10	8	10	9	27	90	6,282	3	11,50
	100	10	8	7	6	21	70	5,524	2	
	10	10	5	4	6	15	50	5,000	1	
metanol	1000	10	9	9	8	26	86,67	6,125	3	9,33
	100	10	8	8	6	22	73,33	5,613	2	
	10	10	4	6	5	15	50	5000	1	

sebanyak 0,6399 g. Fraksi 8 (F₈) sampai fraksi 11 (F₁₁) berupa padatan berwarna hijau yang masih sangat pekat. Uji toksisitas dilakukan pada F₂ sampai dengan F₁₁, ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas toksisitas dari masing-masing fraksi setelah dilakukan pemisahan. Hasil uji toksisitas menunjukkan bahwa F₃ bersifat tidak toksik dengan nilai LC₅₀ ≥ 1.000. Fraksi F₂ bersifat toksik dengan nilai LC₅₀ 874,78 sedangkan F₄ sampai dengan F₁₁ bersifat sangat toksik dengan nilai LC₅₀ berturut-turut adalah 7,88; 0,85; 3,02;

0,23; 8,62; 3,94; 223,46; 168,23 ppm.

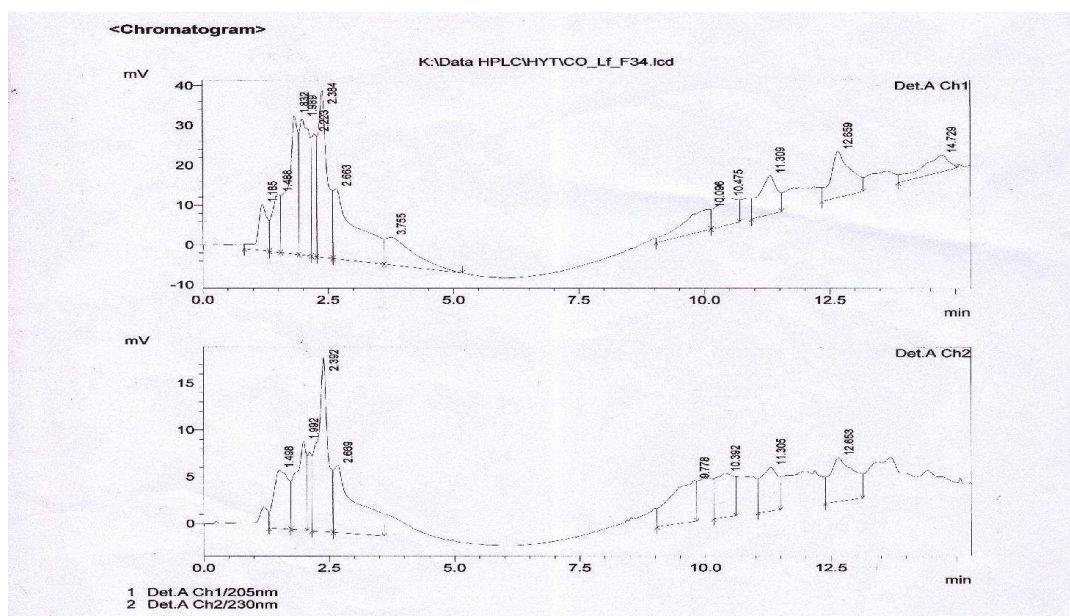
Uji toksisitas tidak dilakukan pada F₁ karena hanya berupa padatan yang jumlahnya sangat sedikit. Fraksi 7 (F₇) dilanjutkan pemisahan dengan kromatografi kolom. Hasil pemisahan dengan kromatografi kolom diperoleh sebanyak 40 fraksi. Hasil kromatografi kolom didapatkan fraksi 34 berupa kristal amorf berwarna putih sedangkan fraksi lainnya berupa bintik-bintik hijau. Hasil KLT fraksi 34 selanjutnya diuji dengan HPLC. Dari hasil HPLC didapatkan bahwa fraksi hasil pemisahan dari

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

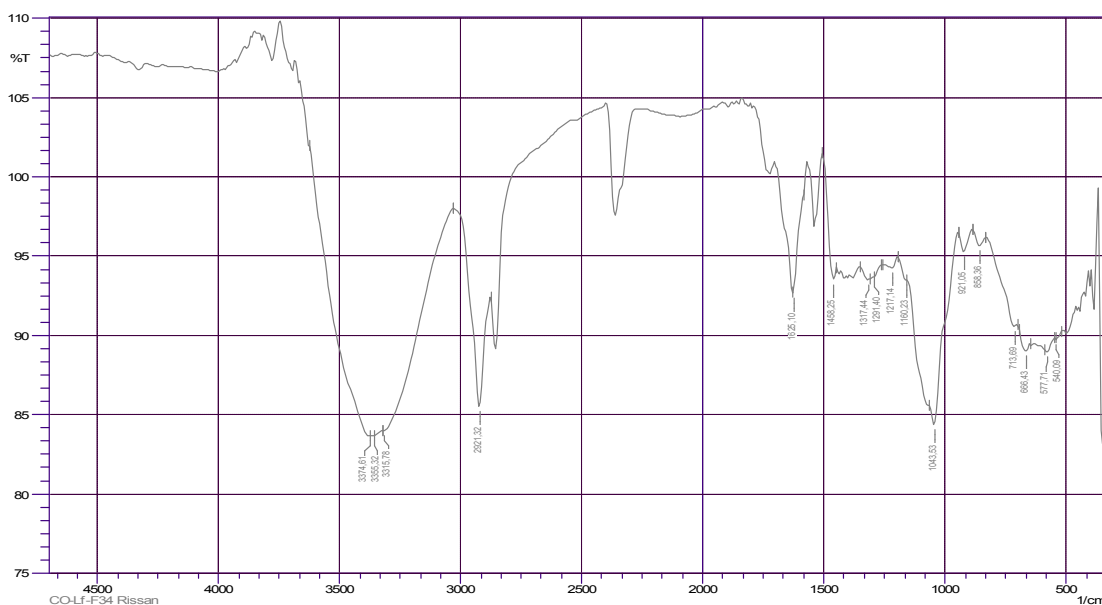
Fraksi	Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva per vial	Jumlah larva udang mati				% Kematian	Nilai probit	Log konsentrasi	LC ₅₀ (ppm)
			I	II	III	Jlh				
F ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F ₂	1000	10	4	6	5	15	50	5,000	3	874,78
	100	10	6	3	3	12	40	4,747	2	
	10	10	2	5	1	8	26,67	4,387	1	
F ₃	1000	10	8	8	9	25	83,33	5,854	3	≥1.000
	100	10	8	4	8	20	66,67	5,468	2	
	10	10	4	4	7	15	50	5,000	1	
F ₄	1000	10	10	10	10	30	100	9,768	3	7,88
	100	10	10	10	9	29	96,67	6,881	2	
	10	10	6	6	8	20	66,67	5,468	1	
F ₅	1000	10	10	10	10	30	100	9,768	3	0,85
	100	10	10	10	10	30	100	9,768	2	
	10	10	10	9	8	27	90	6,282	1	
F ₆	1000	10	10	10	10	30	100	9,768	3	3,02
	100	10	10	10	9	29	96,67	6,881	2	
	10	10	10	8	9	27	90	6,282	1	
F ₇	1000	10	10	10	10	30	100	9,768	3	0,23
	100	10	10	10	10	30	100	9,768	2	
	10	10	10	10	9	29	96,67	6,881	1	
F ₈	1000	10	10	10	10	30	100	9,768	3	8,62
	100	10	7	8	9	24	80	5,842	2	
	10	10	7	8	8	23	76,67	5,772	1	
F ₉	1000	10	9	10	8	27	90	6,282	3	3,94
	100	10	8	9	8	25	83,33	5,854	2	
	10	10	5	8	4	17	56,67	5,182	1	
F ₁₀	1000	10	4	6	8	18	60	5,253	3	223,46
	100	10	5	5	3	13	43,33	4,824	2	
	10	10	2	3	5	10	33,33	4,560	1	
F ₁₁	1000	10	8	7	7	22	73,33	5,613	3	168,23
	100	10	3	5	3	11	36,67	4,668	2	
	10	10	2	2	3	7	23,33	4,261	1	

kolom bukan merupakan senyawa murni dikarenakan kromatogram HPLC menunjukkan banyak puncak seperti yang terlihat pada gambar 1. Puncak-puncak yang muncul pada kromatogram memiliki jarak yang sangat dekat. Waktu

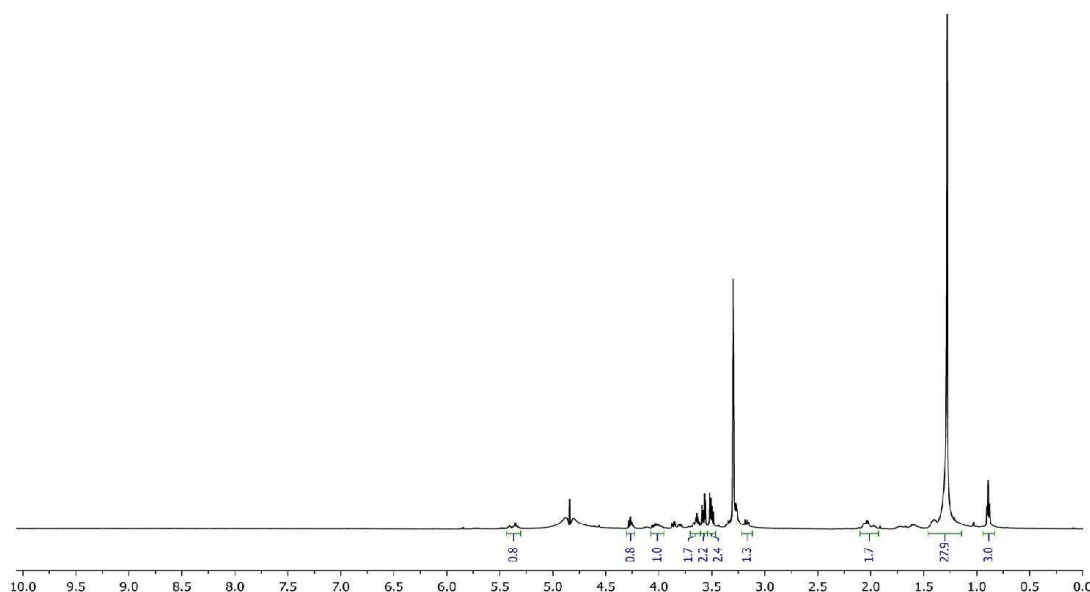
retensi yang memperlihatkan keberadaan puncak dimulai dari 15 menit. Selanjutnya dalam mengidentifikasi komponen senyawa yang terdapat dalam fraksi gabungan hasil pemisahan dari kolom ini dilakukan analisis FTIR untuk



Gambar 1. Hasil analisis HPLC fraksi hasil KLT preparatif



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



Gambar 3. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa V_{34}

melihat gugus fungsi utama dari fraksi gabungan tersebut. Analisis FTIR dapat memperkirakan gugus fungsi apa saja yang terkandung dalam V_{34} 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 pada bilangan gelombang O-H pada bilangan gelombang 3.355 cm^{-1} .

Analisis spektrum $^1\text{H-NMR}$ terhadap V_{34} dalam CDCl_3 dengan frekuensi 500 MHz menunjukkan adanya signal proton. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ menunjukkan $\delta 5,36$ (1H, *m*), dua hidroksi di $\delta 4,27$ (1H, *t*, $J=8;8\text{ Hz}$), dan $\delta 4.01$ (1H, *m*), $\delta 3,65$ (2H, *t*), $\delta 3,58$ (2H, *dd*), $\delta 3,5$ (2H, *dd*), $\delta 3,17$ (1H, *t*, $J=9;7,5$), $\delta 2,1$ (2H, *m*), adanya metilen di $\delta 1.3$ (28H, *brs*, $-\text{CH}_2$), dan adanya satu

metil pada $\delta 0,88$ (3H, *t*, $J=6.5\text{ Hz}$, $J=7\text{ Hz}$ $-\text{CH}_3$). Berdasarkan data pergeseran kimia $^1\text{H-NMR}$ diduga senyawa tersebut memiliki rantai alifatik (*n*-pentadekana) dan satu siklik (sikloheksana).

Struktur senyawa yang terkandung dalam V_{34} tidak dapat diketahui, karena jumlah sampel yang sangat sedikit, sehingga tidak bisa dilakukan analisis lebih lanjut. Namun dalam menentukan kemungkinan senyawa yang terkandung dalam fraksi ini perlu dilakukan analisa menggunakan GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectroscopy*) dikarenakan fraksi ini bukan merupakan senyawa murni.

KESIMPULAN

Hasil identifikasi dengan FTIR dapat dinyatakan bahwa senyawa yang terkandung dalam ekstrak daun tanaman bintaro (*Cerbera odollam* Gaertn) memiliki gugus fungsi O-H. Uji toksisitas dengan metoda BSLT terhadap ekstrak kental metanol, fraksi F₄sampai F₁₁ bersifat sangat toksik. Uji toksisitas fraksi F₂ terhadap kematian larva udang menunjukkan bahwa fraksi ini bersifat toksik. Sedangkan Fraksi F₃ bersifat tidak toksik.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada seluruh pihak yang terlibat yang telah memberikan saran dan masukan demi kesempurnaan penulisan karya ilmiah ini.

DAFTAR PUSTAKA

- 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.
- PROSEA. 2002. *Plant Resources of South-East Asia 12 : Medicinal and Poisonous Plants 2*. PROSEA. Bogor.
- Windadri, F. I, 2003. *Tumbuhan berpotensi ekonomi pulau buton sulawesi tenggara*. LIPI. Bandung
- 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*. 18: 232-235.
- Zetra, Y dan Parasetya, P. (2007). Isolasi Senyawa α -amirin dari Tumbuhan *Beilschmiedia roxburghiana* (Medang) dan Uji Bioaktivitasnya. *Akta Kimindo*, 3: 27-30