

IDENTIFIKASI DAN UJI TOKSISITAS EKSTRAK METANOL DARI DAUN TANAMAN SIRSAK (*Annona muricata* L)

R.Juliani¹, Yuharmen², H.Y. Teruna²

¹Mahasiswa Program Studi S1 Kimia

²Dosen Kimia Organik, Jurusan Kimia

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau

Pekanbaru 28293, Indonesia

rikajuliani@rocketmail.com

ABSTRACT

Soursoup (*Annona muricata* L) was used in herbal medicine. This Annonaceae family member contains alkaloids, tannins, and several other chemical constituents, including asetogenin that allegedly to have cytotoxic potential. The *n*-hexane and methanol macerating method was applied to isolate the secondary metabolites from the stem bark of this plant. The separation was carried out by vacuum liquid chromatography (VLC), column chromatography, and gel chromatography respectively. Characterization of the fractions was established using UV-Vis and FTIR spectrophotometry. Toxicity assay was conducted by *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) method. The LC₅₀ of 3rd to 11th fractions of the methanol extract were 4481.25; 37; 11.46; 0.85; 3.02; 0.23; 10.97; 8.53 and 4093 ppm, respectively. The 3rd and 11th fractions were not toxic, whereas other fractions were toxic and potential to be used as an anticancer.

Keywords : *Annona muricata* L, BSLT, FTIR, toxicity

ABSTRAK

Sirsak (*Annona muricata* L) digunakan sebagai tanaman obat. Salah satu famili Annonaceae ini mengandung alkaloid, tanin, dan beberapa kandungan kimia lainnya termasuk *asetogenin* yang diduga memiliki potensi sitotoksik. Isolasi metabolit sekunder dari tanaman ini menggunakan metode maserasi dengan pelarut *n*-heksana dan metanol. Pemisahannya dilakukan dengan kromatografi vakum cair (KVC), kromatografi kolom, dan kromatografi gel. Karakterisasi dari hasil pemisahan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan FT-IR. Uji Toksisitas dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). LC₅₀ untuk fraksi 3 sampai dengan 11 dari ekstrak metanol berturut-turut adalah 4481,25; 37; 11,46; 0,85; 3,02; 0,23; 10,97; 8,53 dan 4093 ppm. Fraksi 3 dan 11 tidak toksik, sedangkan fraksi-fraksi lainnya bersifat toksik dan berpotensi sebagai antikanker.

Kata kunci : *Annona muricata* L, BSLT, FTIR, toksisitas

PENDAHULUAN

Senyawa kimia aktif dari tumbuhan terkandung dalam akar, daun, biji, kulit batang dan buah. Senyawa kimia di dalam tanaman merupakan hasil metabolisme sekunder dari tanaman itu sendiri (Harborne, 1987).

Tanaman yang digunakan dalam pengobatan herbal salah satunya adalah sirsak (*Annona muricata* L), yang termasuk dalam famili Annonaceae. Daun sirsak telah digunakan oleh sebagian masyarakat Indonesia untuk obat sakit pinggang, mengurangi rasa nyeri, gatal-gatal, reumatik, obat bisul, penurun panas dan bahkan dikatakan dapat mengobati kanker.

Famili Annonaceae merupakan salah satu tanaman penghasil metabolit sekunder. Annonaceae memiliki keanekaragaman kimia, sifat-sifat biologi dan farmakologi, seperti antimikroba, antifungal, sitotoksik, antitumor, dan insektisida dari alkaloid benzoisokuinolin, asetogenin, senyawa-senyawa C-benzilflavonoid dan diterpenoid yang dihasilkan oleh tumbuhan ini (Rupprecht *et al.*, 1990).

Untuk mengisolasi senyawa yang memiliki bioaktivitas maka biasanya dilakukan isolasi yang berdasarkan aktivitas yang salah satunya uji toksisitas. Uji toksisitas yang paling sederhana, mudah dan dapat diandalkan adalah uji toksisitas metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menggunakan larva udang laut *Artemia salina* Leach. Kandungan kimia aktif biologi dapat bersifat racun jika digunakan pada dosis yang tinggi, dengan demikian secara *in vivo* kematian suatu hewan percobaan dapat dipakai sebagai alat pemantau penapisan awal kandungan kimia aktif suatu bahan alam terhadap ekstrak, fraksi maupun isolat (Meyer *et al.*, 1982).

Berdasarkan hal tersebut di atas, maka peneliti tertarik untuk melakukan kajian lebih mendalam tentang tanaman ini. Khususnya kandungan kimia yang terdapat pada daun tanaman sirsak (*Annona muricata* L), agar dapat diperoleh manfaatnya terutama dalam bidang farmasi, kedokteran dan bidang ilmu lainnya yang terkait.

METODE PENELITIAN

a. Penanganan Sampel

Daun tanaman sirsak (*Annona muricata* L) sebanyak 5.000 g diambil di kecamatan Tampan, kota Pekanbaru, provinsi Riau. Daun sirsak terlebih dahulu dikering anginkan dan dijaga agar tidak terkena sinar matahari secara langsung, setelah kering dihaluskan hingga diperoleh serbuk kering.

b. Ekstraksi

Sampel serbuk kering daun sirsak sebanyak 1.400 g direndam di dimaserasi dengan pelarut *n*-heksana selama 1x24 jam pada suhu kamar, lalu diultrasonikasi selama 30 menit dan disaring. Proses ekstraksi ini dilakukan sebanyak empat kali dan maserat yang didapat diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator*, sehingga didapat ekstrak kental *n*-heksana. Residu yang telah kering dimaserasi kembali dengan pelarut metanol sebanyak empat kali, sehingga diperoleh ekstrak kental metanol.

Senyawa-senyawa yang ada dalam ekstrak metanol dipisahkan menggunakan kromatografi kolom vakum cair (KVC), karena bersifat lebih toksik daripada ekstrak *n*-heksana. Kromatografi kolom vakum cair (yang berdiameter 3 cm dan tinggi 20 cm)

diisi dengan silika gel 60 GF₂₅₄ hingga mencapai ketinggian lebih kurang 5 cm. Pengisian kolom dilakukan dalam keadaan vakum. Ekstrak metanol sebanyak 20 g dipreadsorpsi dan dimasukkan ke dalam kolom, kemudian dielusi secara bergradien menggunakan pelarut mulai dari *n*-heksana 100%, campuran *n*-heksana-etilasetat, sampai dengan campuran etilasetat-metanol (1:1). Hasil pemisahan ditampung dalam erlenmeyer yang telah diberi nomor, kemudian dibiarkan hingga pelarutnya menguap.

Senyawa-senyawa yang ada di dalam Fraksi 8 (F₈) dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom karena paling toksik dibandingkan fraksi-fraksi lainnya. Kolom (yang berdiameter 1 cm dan tinggi 50 cm) diisi dengan silika gel 60 GF₂₅₄. Pengisian kolom dilakukan dengan membuat bubuk silika terlebih dahulu, dimasukkan ke dalam kolom dengan menggunakan corong, kemudian dielusi sampai kerapatan silika di dalam kolom maksimum. Sampel F₈ sebanyak 1 g dipreadsorpsi dan dimasukkan ke dalam kolom, kemudian dielusi secara bergradien menggunakan pelarut *n*-heksana, *n*-heksana-etilasetat sampai perbandingan etilasetat-metanol (1:1). Hasil pemisahan ditampung dalam vial yang telah ditimbang massanya dan telah diberi nomor, kemudian dibiarkan hingga pelarutnya menguap.

Senyawa-senyawa yang ada dalam gabungan vial nomor 31 sampai vial nomor 37 (Vg-1) hasil kromatografi kolom dilakukan pemisahan dengan kromatografi gel. Kolom (yang berdiameter 1 cm dan tinggi 50 cm) diisi dengan Sephadex-LH20. Pengisian kolom dilakukan dengan cara mengalirkan pelarut. Sampel Vg-1 sebanyak 0,152 g dimasukkan ke dalam kolom, kemudian dielusi menggunakan eluen etilasetat-metanol (1:1). Hasil pemisahan ditampung dalam vial yang telah ditimbang massanya dan telah diberi nomor, kemudian dibiarkan hingga pelarutnya menguap.

Pemeriksaan komponen yang terkandung dalam vial hasil kromatografi gel dilakukan dengan KLT. Plat KLT diberikan batas atas dan bawah, masing-masing 1 cm dari atas dan bawah plat. Vial nomor 4 (V₄) sampai dengan vial nomor 7 (V₇) ditotolkan pada plat KLT sesuai dengan nomor yang telah diberikan, dielusi dengan perbandingan eluen *n*-heksana-etilasetat (1:9) sampai pada batas atas plat yang telah ditandai, kemudian plat diangkat. Noda yang dihasilkan ditandai dengan pensil yang dibantu melihatnya dengan lampu UV. V₅ sampai dengan V₇ digabung ke dalam satu vial (Vg-1a), kemudian diuji dengan KLT menggunakan eluen *n*-heksana-etilasetat (2:8).

Analisis senyawa hasil isolasi dilakukan dengan spektrofotometri UV dan FTIR. Jumlah gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa ditunjukkan oleh jumlah puncak (*peak*) pada spektrum IR.

c. Uji Toksisitas

Uji toksisitas tahap awal dilakukan pada ekstrak *n*-heksana dan ekstrak metanol daun sirsak dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Ekstrak masing-masing 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 5 mL metanol, maka diperoleh larutan dengan konsentrasi 1.000 ppm. Larutan ini dipipet sebanyak 0,5 mL ke dalam vial dan ditambahkan 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 3 (F_3) 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 daun tanaman sirsak (*Annona muricata* L) sebanyak 5.000 g yang diambil dari kecamatan Tampan, kota Pekanbaru, provinsi Riau. Berat sampel setelah dikeringkan menjadi 1.400 g.

Serbuk kering daun sirsak yang telah dihaluskan dimaserasi dengan pelarut *n*-heksana untuk memisahkan senyawa nonpolar yang terkandung di dalam daun sirsak, sebelum maserat disaring dilakukan ultrasonikasi selama ± 30 menit, ini bertujuan untuk memperbesar kelarutan senyawa kimia ke dalam pelarut. Gelombang ultrasonik yang dikeluarkan alat ini dapat menggetarkan sampel sehingga senyawa kimia yang ada di dalam sampel akan keluar dan larut dalam pelarut yang digunakan. Ekstrak kental *n*-heksana diperoleh sebanyak 83,9 g berwarna hijau tua. Residu yang telah kering diekstrak kembali dengan pelarut metanol dengan perlakuan yang sama, untuk memisahkan senyawa polar yang terkandung di dalam daun sirsak. Ekstrak kental metanol diperoleh sebanyak 210,2 g berwarna hijau kehitaman. Hasil pengujian fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak *n*-heksana memiliki kandungan metabolit sekunder golongan steroid, sedangkan ekstrak metanol memiliki kandungan metabolit sekunder golongan flavonoid, saponin dan steroid.

Uji toksisitas tahap awal dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dilakukan terhadap ekstrak kental *n*-heksana dan metanol untuk mengetahui aktivitas toksisitas dari ekstrak kental daun sirsak apakah memberikan aktivitas yang positif atau tidak. Hasil uji menunjukkan bahwa ekstrak metanol bersifat lebih toksik dibandingkan dengan ekstrak *n*-heksana, dengan nilai LC_{50} 27,13 ppm pada ekstrak kental *n*-heksana dan 0,85 ppm pada ekstrak kental metanol, datanya dapat dilihat pada Tabel 1.

Pemisahan pertama kali dilakukan dengan menggunakan kromatografi vakum cair (KVC). Pengisian kolom dilakukan secara vakum agar diperoleh kerapatan kemasan maksimum. Hasil pemisahan dengan kromatografi vakum cair diperoleh 11 fraksi. Uji toksisitas dilakukan pada F_3 sampai dengan F_{11} , karena F_1 dan F_2 hanya berupa minyak yang jumlahnya sangat sedikit. Hasil uji toksisitas dari F_3 sampai F_{11} diperoleh nilai LC_{50} berturut-turut adalah 4481,25; 37; 11,46; 0,85; 3,02; 0,23; 10,97; 8,53 dan 4093 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa F_8 bersifat paling toksik daripada fraksi-fraksi lainnya. Data hasil uji toksisitasnya dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 1: Hasil uji toksisitas ekstrak kental daun tanaman *Annona muricata* L

Ekstrak	Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva per vial	Jumlah larva udang mati				% kematian	Nilai probit	LC ₅₀ (ppm)
			I	II	III	Jlh			
<i>n</i> -heksana	1.000	10	10	10	10	30	100%	9,768	27,3
	100	10	9	7	8	24	80%	5,842	
	10	10	2	4	0	6	20%	4,158	
metanol	1.000	10	10	10	10	30	100%	9,768	0,85
	100	10	10	10	10	30	100%	9,768	
	10	10	8	10	9	27	90%	6,282	

Tabel 2: Hasil uji toksisitas fraksi metanol hasil KVC daun *Annona muricata* L

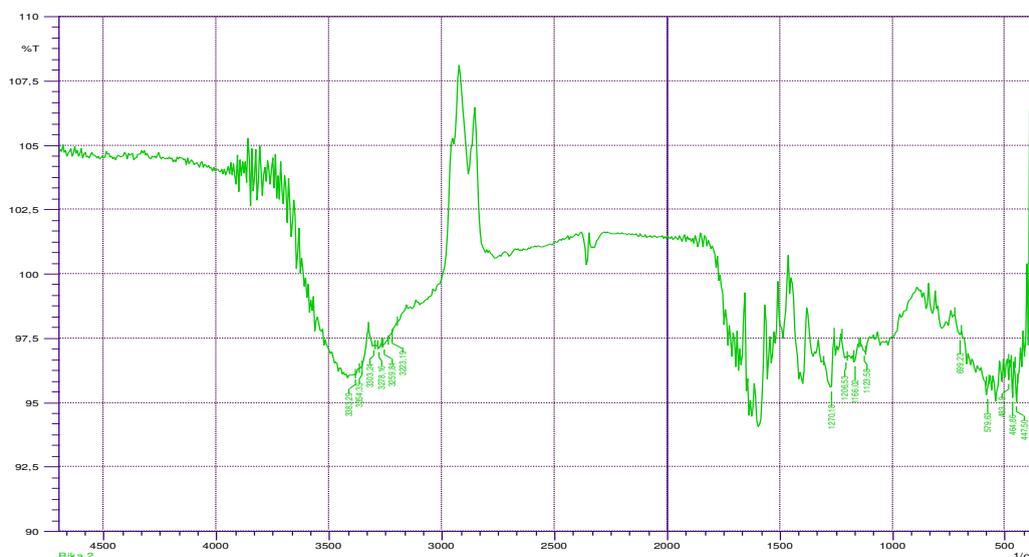
Fraksi	Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva per vial	Jumlah larva udang mati				% kematian	Nilai probit	LC ₅₀ (ppm)
			I	II	III	Jlh			
F3	1.000	10	3	5	4	12	40%	4,747	4481,25
	100	10	5	2	2	9	30%	4,476	
	10	10	1	4	0	5	16,66%	4,046	
F4	1.000	10	7	7	8	22	73,33%	5,613	37
	100	10	7	3	7	17	56,66%	5,202	
	10	10	3	3	6	12	40%	4,747	
F5	1.000	10	10	10	10	30	100%	9,768	11,46
	100	10	10	10	8	28	93,33%	5,842	
	10	10	5	5	7	17	56,66%	4,158	
F6	1.000	10	10	10	10	30	100%	9,768	0,85
	100	10	10	10	10	30	100%	9,768	
	10	10	10	9	8	27	90%	6,282	
F7	1.000	10	10	10	10	30	100%	9,768	3,02
	100	10	10	10	9	29	96,66%	6,881	
	10	10	10	8	9	27	90%	6,282	
F8	1.000	10	10	10	10	30	100%	9,768	0,23
	100	10	10	10	10	30	100%	9,768	
	10	10	10	10	9	29	96,66%	6,881	
F9	1.000	10	10	10	10	30	100%	9,768	10,97
	100	10	8	8	9	25	83,33%	5,954	
	10	10	6	7	7	20	66,66%	5,468	
F10	1.000	10	9	10	7	26	86,66%	6,175	8,53
	100	10	7	9	8	24	80%	5,842	
	10	10	4	7	3	14	46,66%	4,950	
F11	1.000	10	2	4	7	13	43,33%	4,824	4093
	100	10	4	4	2	10	33,33%	4,560	
	10	10	1	2	4	7	23,33%	4,261	

Fraksi 8 (F₈) dilanjutkan pemisahan dengan kromatografi kolom dan diperoleh hasil pemisahan sebanyak 119 vial, sebagian besar vial yang dihasilkan kosong, hanya berupa titik-titik minyak. Vial nomor 31 (V₃₁) sampai vial nomor 37 (V₃₇) digabung menjadi satu untuk memudahkan pemisahan.

Kromatografi gel dilakukan terhadap gabungan vial nomor 31 sampai 37 (Vg-1) hasil kromatografi kolom dan diperoleh hasil pemisahan sebanyak 11 vial. Eluen yang

digunakan adalah etilasetat-metanol (1:1) secara isokratik. Hasil KLT dari Vial Nomor 5 sampai Vial Nomor 7 karena memiliki nilai R_f yang relatif sama maka digabungkan menjadi satu (Vg-1a).

Analisis UV menunjukkan adanya satu absorbansi maksimum pada panjang gelombang 298 nm. Hal ini menunjukkan bahwa Vg-1a yang dihasilkan mempunyai ikatan rangkap. Analisis HPLC menunjukkan bahwa Vg-1a masih mengandung banyak senyawa (belum murni), dan analisis FTIR menunjukkan adanya pita serapan C-O pada bilangan gelombang 1.270 cm^{-1} , pita serapan C=O pada bilangan gelombang 1.600-an cm^{-1} dan pita serapan O-H pada bilangan gelombang 3.383 cm^{-1} .



Gambar 1. Spektrum FTIR Vg-1a

KESIMPULAN

Identifikasi dengan FTIR menyatakan bahwa senyawa yang terkandung dalam fraksi metanol daun tanaman *Annona muricata* L memiliki gugus C-O, C=O dan O-H. Hasil uji toksisitas fraksi metanol menunjukkan bahwa fraksi 3 dan fraksi 11 tidak toksik sama sekali, sedangkan fraksi lainnya bersifat toksik dan berpotensi sebagai antikanker.

DAFTAR PUSTAKA

- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia Penentuan Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Edisi Ke-2, Terjemahan K. Padmawinata dan I. Soediro, Penerbit ITB, Bandung.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putman, J.E., Jacobson, L.B., Nichol, D.E., dan Mclaughin, J.L. 1982. *Brine Shrimp : A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents*. J. A Willey Interscience Publication. John Willey and Sons. New York.
- Rupprecht, J. K., Hua Hui, Y dan Mc Laughlin, J. L. 1990. *Annonaceous Acetogenins A Review*, *J. Nat. Prod.*, 53 (2) : 237-238.