

## UJI TOKSISITAS KULIT BATANG MAKUTADEWA (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.)Boerl.) TERHADAP *Artemia salina* Leach DAN PROFIL KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS FRAKSI AKTIF

### TOXICITY TEST OF MAKUTADEWA (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.)Boerl.) BARK AGAINST *Artemia salina* Leach AND THIN LAYER CHROMATOGRAPHY PROFILE OF THE ACTIVE FRACTION

Triana Hertiani dan Silvia Utami Tunjung Pratiwi  
Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada

#### ABSTRAK

Tanaman makutadewa, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.)Boerl. merupakan tanaman yang telah banyak digunakan oleh masyarakat sebagai obat antikanker, tetapi belum terdapat bukti ilmiah tentang aktivitas tersebut. Hanya saja tanaman satu famili yaitu *Daphne mezereum* telah diteliti dalam kulit batangnya mengandung senyawa sitotoksik. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan uji toksisitas kulit batang tanaman makutadewa terhadap *Artemia salina* Leach sebagai uji pendahuluan aktivitas antikanker dan kemungkinan senyawa yang bertanggungjawab terhadap aktivitas tersebut.

Penelitian dilakukan dengan terlebih dahulu melakukan penyarian serbuk bahan menggunakan kloroform sebagai pelarut dengan Soxhlet. Residu kloroform yang diperoleh disari dengan metanol menggunakan Soxhlet dan residu metanol diinfundasi. Ekstrak kloroform, metanol dan air diuji toksisitasnya terhadap *A. salina*. Ekstrak paling aktif yaitu kloroform ( $LC_{50}$  29,6  $\pm$  0,1 /ml) difraksinasi dengan menggunakan *vacuum coloum chromatography*, fase gerak wash bensin 100% (a); wash bensin-etilasetat perbandingan 20:1 (b); 15:1 (c); 10:1 (d); 5:1 (e); 2:1 (f); dan kloroform-metanol 1:1 (g). Fraksi yang diperoleh diuji toksisitasnya terhadap *A. salina* sehingga diperoleh fraksi aktif yaitu fraksi E (hasil penggabungan fraksi (e) dan (f)) dan F (hasil fraksinasi (g)).

Uji toksisitas fraksi E dan F menunjukkan potensi yang lebih rendah dari ekstraknya. Harga  $LC_{50}$  fraksi E adalah 106,94  $\mu$ g/ml sedangkan fraksi F  $LC_{50}$  131,53  $\mu$ g/ml. Profil kromatografi menunjukkan bahwa dalam fraksi tersebut kemungkinan terdapat senyawa-senyawa terpenoid dan alkaloid.

**Kata kunci:** uji toksisitas, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.)Boerl., kulit batang

#### ABSTRACT

Makutadewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl.) is one of the herbal medicines used against cancer, however, the scientific basis of the activity still void. *Daphne mezereum*, the same family (Thymelaeaceae) to makutadewa has been proved to contain cytotoxic substances in its bark. Therefore, the aims of this research were to investigate the toxic effect of makutadewa bark against *Artemia salina* Leach. as the primary step to identify an anticancer activity and find out substances responsible to this activity.

The material powder was extracted using Soxhlet apparatus with chloroform, followed by methanol and finally by distilled water. The toxicity of chloroform, methanolic and aqueous extracts were assayed against *A.salina* Leach. The chloroform extract (most active) with the  $LC_{50}$  of 29.6  $\pm$  0.14  $\mu$ g/ml was fractionated by vacuum liquid chromatography using wash benzene 100 % (a); wash benzene-ethyl acetate =20:1 (b); 15:1 (c); 10:1 (d); 5:1 (e); 2:1 (f) and chloroform-methanol 1:1 (g) as mobile phases. The active fractions against *A.salina* were E {combination of (e) and (f)} with  $LC_{50}$  of 106,9  $\mu$ g/ml and F (g) with the  $LC_{50}$  of 131,53  $\mu$ g/ml, hence less toxic than the original extract. The thin layer chromatogram profiles showed that E and F fractions contained terpenoid and alkaloid substances.

**Key words:** toxicity test, (*Phaleria macrocarpa* (Scheff)Boerl.), bark

## PENDAHULUAN

Makutadewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl) merupakan tanaman yang telah banyak dipergunakan oleh masyarakat sebagai antikanker. Belum banyak penelitian yang telah dilakukan terhadap aktivitas tersebut. Penelitian yang telah dilakukan pada tanaman satu suku yaitu *Daphne sp.* menunjukkan bahwa pada kulit batang tanaman tersebut terdapat suatu senyawa terpenoid yang memiliki aktivitas sitotoksik. Berdasarkan studi kemotaksonomi bahwa tanaman yang memiliki kekerabatan dekat kemungkinan memiliki kandungan kimia yang hampir sama maka diperkirakan bahwa dalam kulit batang makutadewa terdapat senyawa yang memiliki aktivitas sitotoksik.

Sebagai skrining awal senyawa antikanker, metode yang dapat dipergunakan adalah metode *Brine Shrimp lethality Test* (BST) yaitu uji toksisitas senyawa terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Metode ini telah dibuktikan memiliki korelasi dengan daya sitotoksik senyawa-senyawa antikanker (Meyer *et al.*, 1982). Selain itu, metode ini mudah, murah, cepat dan cukup akurat. Hal tersebut mendorong dilakukannya penelitian uji toksisitas kulit batang makutadewa terhadap larva udang *Artemia salina* Leach.

*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. termasuk dalam divisi Spermatophyta, sub divisi Angiospermae, kelas Dicotyledonae dan bangsa Thymelaeae, suku Thymelaeaceae, marga Phaleria. Tanaman ini di daerah Melayu dikenal sebagai buah simalakama sedangkan di daerah Jawa dikenal sebagai makutadewa. Daun dan kulit buah dari tanaman ini mengandung alkaloid dan saponin, di samping itu daunnya juga mengandung polifenol, dan kulit buahnya mengandung flavonoid. Daun dan buahnya berkhasiat sebagai obat disentri, obat sakit kulit dan antitumor (Djumidi dkk., 1999)

Aktivitas antitumor dari tanaman ini belum dibuktikan secara ilmiah, tetapi tanaman dari suku yang sama yaitu *Daphne sp.* diketahui mengandung senyawa terpenoid yang bersifat sitotoksik (Duke, 2001). Berdasarkan studi kemotaksonomi maka tanaman yang memiliki kekerabatan cukup dekat kemungkinan memiliki kandungan senyawa yang hampir sama. Diharapkan dalam kulit batang makutadewa juga terdapat senyawa beraktivitas sitotoksik.

Metode BST menggunakan hewan uji larva udang *Artemia salina* Leach merupakan salah satu metode yang banyak digunakan untuk pencarian senyawa antikanker baru yang berasal dari tanaman. Hasil uji toksisitas ini dapat diketahui dari jumlah kematian anak udang *Artemia salina* Leach. karena pengaruh ekstrak atau senyawa bahan alam tumbuhan tertentu dari dosis yang telah ditentukan (McLaughlin dan Ferrigni, 1983). Metode ini dilakukan dengan menentukan besarnya  $LC_{50}$  selama 24 jam (Meyer *et al.*, 1982). Suatu ekstrak tanaman atau senyawa hasil isolasi yang memiliki nilai  $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$  dapat diduga memiliki efek sitotoksik (Dwiatmaka, 2000).

Fraaksinasi dalam penelitian ini dilakukan dengan metode *Vaccum Liquid Chromatography* (VLC). Metode ini merupakan metode preparatif seperti kolom kromatografi yang dipercepat dengan hampa. Elusi dilakukan secara bertingkat polaritasnya dari polaritas paling rendah sampai yang paling tinggi dan setiap kali elusi, eluen dihisap dengan pompa hampa sampai kering. Metode ini sangat praktis, cepat, dan murah dengan hasil yang baik.

Prinsip pemisahan senyawa pada metode ini didasarkan pada kelarutan senyawa yang dipisahkan pada fase gerak yang dipergunakan. Penggunaan fase gerak dengan bertingkat polaritasnya diharapkan dapat memisahkan senyawa-senyawa yang memiliki polaritas berbeda, dan dengan menghisap eluen sampai kering setiap kali dipergunakan eluen baru menyebabkan kemampuan pemisahannya meningkat (Coll dan Bowden, 1986).

## METODOLOGI

### Bahan

Kulit batang makutadewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) dipanen pada bulan September 2000, determinasi bahan dilakukan di Laboratorium Farmakognosi, Fakultas Farmasi UGM; telur *A. salina*; (Premium Extra Brine Shrimp Eggs, HS No. 0511.99.600 Seagull International, The Great Salt Lake City, USA), air laut; Dimetil Sulfoksida (DMSO), *wash* bensin dan etilasetat.

### Alat

Alat VLC, alat uji BST dan peralatan Soxhlet, vortex.

### Cara Penelitian

#### Ekstraksi bahan

Bahan diekstraksi dengan Soxhlet menggunakan kloroform, residu disari lagi dengan metanol, menggunakan alat Soxhlet dan terakhir residu metanol diinfundasi. Ekstrak yang diperoleh disebut sebagai ekstrak kloroform, ekstrak metanol dan ekstrak air, masing-masing diuapkan sampai kental.

#### Uji BST

Telur udang ditetaskan dalam wadah berisi air laut asli yang telah diencerkan 1:1 (salinitas 16/mill, pH 8). Suatu pembatas dari plastik dengan lubang diameter 2 mm digunakan untuk membuat dua kompartemen. Telur sebanyak 50 mg ditempatkan dalam kompartemen gelap, 24 jam kemudian larva dipisahkan dari telur yang belum menetas, 48 jam kemudian larva udang siap untuk digunakan dalam pengujian

Untuk ekstrak kloroform dan metanol di setiap flakon yang telah di beri larutan uji dan diangin-anginkan sampai tidak berbau pelarut, ditambahkan DMSO 20 µl. Kepada tiap flakon ditambahkan air laut 1 ml dan diaduk dengan bantuan vortex.. Kemudian sepuluh ekor larva udang dipindah ke dalam masing-masing flakon sampel dan kontrol yang sudah disiapkan dengan menggunakan pipet, dan ditambahkan air laut sampai volume 5 ml. Ditambahkan 1 tetes suspensi ragi (3 mg ragi dalam 5 ml air laut), dibiarkan selama 24 jam, kemudian dihitung jumlah larva udang yang mati. Bila ada kematian pada kontrol dikoreksi dengan rumus Abbot (Meyer *et al.*, 1982):

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{Tes - kontrol}}{\text{kontrol}} \times 100\% \quad (1)$$

#### Fraksinasi

Orientasi fase gerak dilakukan dengan menggunakan berbagai sistem KLT, diketahui bahwa pemisahan terbaik dengan heksan-etil asetat (7:3).

KLT dilakukan dengan memasukkan silika gel ke dalam kolom (diameter 5 cm) sambil dihampakan hingga diperoleh kolom padat dengan tinggi ± 5 cm.

Eluasi dilakukan dengan menuang fase gerak yaitu berturut-turut: Wash bensin (2 x 30 ml)(aI dan aII); wash bensin-etilasetat 20:1 (2 x 30 ml)(bI dan bII); 15:1 (2 x 30 ml)(cI dan cII); 10:1 (2 x 30 ml) (dI dan dII); 5:1 (2 x 30 ml) (eI dan eII); 2:1 (2 x 50 ml)(f); kloroform-metanol 1:1 (2 x 30 ml)(gI dan gII)

Hasil fraksinasi diuji menggunakan fase diam silika gel GF 254 nm fase gerak heksan-etil asetat 7:3; dan 4:1 dengan detektor serum sulfas. Fraksi dengan pola KLT yang sama digabung sehingga diperoleh fraksi A – F.

#### Analisis hasil

Data berupa % kematian *A. salina* masing-masing konsentrasi dianalisis secara probit sehingga diperoleh LC<sub>50</sub>.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian awal uji daya toksisitas ekstrak kloroform, metanol dan air terhadap *A. salina* dimulai dari kadar 1000 µg/ml dan ternyata masing-masing ekstrak adalah toksis karena s/d kadar 1000 µg/ml masih menyebabkan > 50% kematian larva uji. Meyer *et al.*, (1982) menyebutkan bahwa ekstrak tanaman dikatakan toksis jika memiliki LC<sub>50</sub> <1000 µg/ml. Dengan demikian seluruh ekstrak diuji lebih lanjut sehingga diperoleh harga LC<sub>50</sub> nya (Tabel I).

Tabel I. Harga LC<sub>50</sub> ekstrak kulit batang makutadewa

Jenis Ekstrak	LC <sub>50</sub> (µg/ml)
Ekstrak Air	482 ± 12
Ekstrak Metanol	39 ± 3
Ekstrak Kloroform	29,6 ± 0,1

Pada uji untuk ekstrak kloroform perlu ditambahkan surfaktan yang inert atau tidak berefek pada *A. salina*. Hasil orientasi menunjukkan bahwa DMSO merupakan surfaktan yang paling baik dan kadar minimal yang sudah dapat melarutkan ekstrak tanpa menimbulkan efek toksis adalah 20 µl/5 ml.

Perhitungan harga LC<sub>50</sub> menunjukkan bahwa ekstrak kloroform merupakan ekstrak yang paling poten. Dengan demikian maka ekstrak kloroform yang dimurnikan lebih lanjut menggunakan metode VLC.

Hasil VLC berupa 13 fraksi yang kemudian dilakukan penggabungan beberapa fraksi berdasarkan hasil uji KLTnya sehingga menjadi 6 fraksi yaitu A - F. (Tabel II)

Tabel II hasil penggabungan fraksi hasil elusi bertingkat

Kode Fraksi	Asal fraksi yang digabung	Jenis eluen yang digunakan
A	fraksi aI – bI	(wash bensin 100% (I dan II) dan wash bensin-etilasetat (20:1) (I)).
B	(II).	wash bensin-etilasetat (20:1)
C	fraksi cI – dI	(wash bensin-etilasetat (15:1) (I dan II) dan wash bensin-etilasetat (10:1) (I)). merupakan hasil fraksinasi
D	DII	(wash bensin-etilasetat (10:1) (II)).
E	fraksi eI-F	( wash bensin-etilasetat (5:1) (I dan II) dan wash bensin-etilasetat (35:15)
F	fraksi gI dan gII	(kloroform-metanol (1:1) (I dan II))

Masing-masing fraksi tersebut (Tabel II) diuji daya toksisitasnya terhadap *A. salina* yaitu pada kadar 40 µg/ml dan 30 µg/ml berdasarkan data LC<sub>50</sub> ekstrak yaitu 29,65 µg/ml. Diharapkan pada kadar tersebut dapat dideteksi fraksi mana yang bertanggung-jawab terhadap aktivitas dari ekstrak kloroform.

Tabel III. Hasil perhitungan % kematian larva *A. salina* pada fraksi E dan F

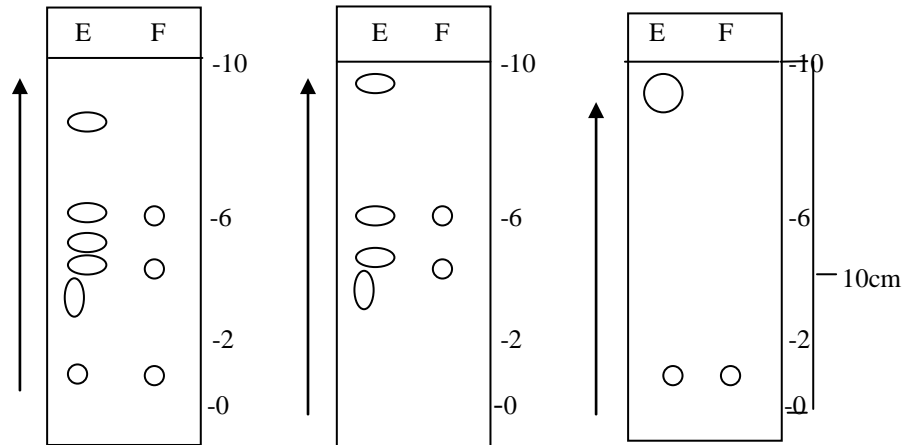
Kadar µg/ml	Log kadar (x)	E		F	
		%	Probit (y)	%	Probit (y)
25	1,398	8	3,60	0	-
50	1,699	18	4,08	12	3,82
100	2	68	5,46	34	4,58
200	2,301	74	5,64	78	5,77
400	2,602	82	5,92	88	6,18
Persamaan garis		Y = 2,060 X + 0,820 r = 0,950365976		Y = 2,747 X - 0,821 r = 0,9815579	

Hasil uji toksisitas masing-masing fraksi tersebut menunjukkan bahwa hanya fraksi E dan F yang masih menunjukkan aktivitas pada kadar tersebut, yaitu pada kadar 30 µg/ml dan 40 µg/ml fraksi E menimbulkan kematian *A. salina* sebesar 18% sedangkan fraksi F berturut-turut 4% dan 28%, fraksi lainnya 0%. (Tabel II).

Hasil perhitungan LC<sub>50</sub> fraksi E menunjukkan harga 106 µg/ml dan fraksi F memiliki LC<sub>50</sub> 131 µg/ml. Penurunan ketoksikan fraksi E dan F dibandingkan ekstrak kloroform kemungkinan disebabkan rendahnya kelarutan fraksi tersebut dalam air laut walaupun sudah ditambah DMSO sehingga kontak antara *A. salina* dan ekstrak berkurang. Kemungkinan ada senyawa lain dalam fraksi A – D yang dapat meningkatkan potensi senyawa aktif antara lain dengan cara meningkatkan kelarutan senyawa aktif dalam fraksi E atau F. Fraksi tersebut dicek profil KLTnya untuk mendapatkan gambaran kemungkinan senyawa yang bertanggung-jawab terhadap aktivitas tersebut.

Profil KLT menunjukkan bahwa fraksi E dan F kemungkinan mengandung senyawa alkaloid dan terpenoid seperti terlihat pada gambar 1 dengan perincian seperti pada tabel III. Senyawa alkaloid ditunjukkan dengan pembentukan warna oranye-merah dengan penyemprotan pereaksi Dragendorff sedangkan senyawa terpenoid ditunjukkan dengan pembentukan warna biru dan coklat pada penyemprotan dengan pereaksi vanilin asam fosfat diikuti pemanasan. Uji terhadap adanya senyawa polifenol dan flavonoid dengan pereaksi FeCl<sub>3</sub> dan uap NH<sub>3</sub> menunjukkan hasil negatif.

Sistem kromatografi yang digunakan adalah silika gel GF 254 sebagai fase diam dan sebagai fase gerak adalah heksan-etilasetat (2: 1) pengembangan 2 kali.



Gambar 1. Profil KLT Fraksi E dan F

Keterangan: Dari kiri ke kanan: deteksi dengan sinar UV 254, vanilin asam-fosfat dan Dragendorff; Fraksi E di sebelah kiri dan F sebelah kanan.

Tabel IV. Profil KLT Fraksi E dan F

HRf		uv 254 nm		Vanilin asam-fosfat		Dragendorff		FeCl <sub>3</sub>		Uap NH <sub>3</sub>	
E	F	E	F	E	F	E	F	E	F	E	F
0	0	P	P	-	-	OM	O	-	-	-	-
25	2	P	P	B	B	-	M	-	-	-	-
40	2	P	P	C	B	-	-	-	-	-	-
48	3	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56	8	P	-	C	-	-	-	-	-	-	-
72	-	P	-	C	-	-	-	-	-	-	-
82	-	-	-	-	-	OM	-	-	-	-	-

Keterangan: P = pemadaman; C = coklat; B = biru; OM = oranye merah; E = fraksi E, dan F = fraksi F

Adanya senyawa terpenoid pada fraksi aktif baik E maupun F kemungkinan dapat dihubungkan secara kemotaksonomi dengan keberadaan senyawa sitotoksik yang terdapat pada tanaman satu familia dengan makutodewa yaitu *Daphne mezereum*. Senyawa aktif dalam kulit batang tanaman tersebut adalah daphnoretin (Duke, 2001) suatu turunan kumarin-monoterpen (Kwak *et al.*, 2001) yang telah diketahui aktif terhadap leukemia selain itu senyawa mezerein suatu diterpen merupakan senyawa aktif antileukemia terdapat pada buah tanaman tersebut (Vrana dan Grant, 2001). Tetapi hal tersebut masih membutuhkan pembuktian lebih lanjut karena senyawa alkaloid juga banyak yang diketahui mempunyai aktivitas sebagai antikanker.

## KESIMPULAN

Uji daya toksisitas kulit batang makutadewa terhadap *A. salina* menunjukkan bahwa ekstrak kloroform memiliki LC<sub>50</sub> sebesar 29,6 ± 0,1 µg/ml; fraksi E dan F memiliki LC<sub>50</sub> > dari ekstrak kloroform. Harga LC<sub>50</sub> fraksi E adalah 106,94 µg/ml dan fraksi F LC<sub>50</sub> 131,53 µg/ml. Senyawa yang terkandung dalam fraksi E dan F adalah senyawa terpenoid dan alkaloid

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Dr. Suwijoyo Pramono, Apt, selaku Pembimbing, dan kepada Lembaga Penelitian UGM yang telah mendanai penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Coll, J.C., and Bowden, B.F., 1986, The Application of Vacuum Liquid Chromatography To The Separation of Terpen Mixtures, *J. Nat. Prod.*, 49 (5), 934-936
- Djumidi, Sutjipto, Gotama, Sugiarto, S., Nurhadi, M., Widyastuti, Y., Wahyono, S., dan Prapti, I.Y., 1999, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*, Ed 5, DepKes RI, Jakarta. , 147-148
- Duke, 2001, *Phytochemical and Ethnobotanical Database*, *Daphne mezereum* L., <http://www.arsgrin.gov/duke/farmacy>
- Dwiatmaka, Y., 2000, Skrining tanaman Berkhasiat Antikanker Dengan Metode “BST”, dalam Yuswanto, Ag. dan Sinaradi (Eds.), *Kanker*, Penerbitan Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta 110-113
- Kwak, J.H., Lee K.B., dan Schmitz F.J., 2001, Four New Coumarin Derivatives from *Artemisia keiskeana*, *J.Nat.Prod.*, 64, 8
- McLaughlin, J.L., and Ferrigni, N.R., 1983, Potato Discs and Brine Shrimp: Two Simple Bioassays for Antitumor Prescreening and Fractionating Monitoring, *Proceeding of Symposium on Discovery and Development of Naturally Occuring Antitumor Agents*, National Cancer Institute, Frederick, Maryland, 9 – 12.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., and McLaughlin, J.L., 1982, Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituent, *Planta Medica*, 45, 31-34.
- Vrana, J.A., dan Grant, S., 2001, Synergistic Induction of Apoptosis in Human Leukemia cells (U937) Exposed to Bryostatin 1 and the Proteasome Inhibitor Lactacystin Involves Dysregulation of the PKC/MAPK Cascade, *Blood*, 97(7)