



Isolasi Senyawa Flavonoid Aktif Berkehasiat Sitotoksik Dari Daun Kemuning (*Murraya Paniculata* L. Jack)

Morina Adfa

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Bengkulu, Indonesia

Diterima 9 Mei 2007; Disetujui 12 Juni 2007

Abstrak - Telah diisolasi senyawa flavonoid golongan flavon (*apigenin*) berupa kristal berwarna kuning muda sebanyak 30 mg dari daun kemuning (*Murraya paniculata* L. Jack) dengan titik leleh (195-196° C). Dari hasil uji *Brine Shrimp Lethality Test* terhadap senyawa ini tidak memberikan efek toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan LC₅₀ 194,786 µg/ml. Karakterisasi senyawa hasil isolasi telah dilakukan dengan Kromatografi lapis tipis (KLT), spektrum UV dan IR

Kata Kunci: flavon (*apigenin*); *Murraya paniculata* L. Jack; *Brine Shrimp Lethality Test*

1. Pendahuluan

Kemuning dengan nama latinnya *Murraya paniculata* L. Jack dan sinonim *Murraya exotica* termasuk suku jeruk-jerukan, merupakan perdu atau pohon kecil bercabang banyak dan merupakan salah satu tanaman yang digunakan untuk obat tradisional seperti obat sakit gigi, infeksi saluran kencing, *ulcerpains*, memar terpukul, sakit reumatik, gigitan serangga, gigitan ular, bisul dan koreng. Rebusan daun kemuning ini digunakan pula untuk mengobati haid yang tidak teratur, lemak tubuh berlebihan serta untuk memperkuat kontraksi uterus bagi ibu yang habis melahirkan [7].

Berdasarkan penelusuran literatur terhadap tumbuhan kemuning diperoleh informasi omphamurin yang berupa kristal putih dari daun kemuning telah berhasil diisolasi dengan pelarut n-heksana [12]. Kristal murrayatin dari daun kemuning telah diperoleh dengan menggunakan pelarut petrol [2] dan senyawa kumarin dari daun kemuning telah berhasil diisolasi [5].

Namun sejauh ini belum ada laporan tentang senyawa flavonoid serta bioaktivitasnya dari daun kemuning, sedangkan dari uji pendahuluan dengan pereaksi sianidin test daun tanaman kemuning positif mengandung flavonoid. Dan dari uji pendahuluan menggunakan plat kromatografi lapisan tipis (KLT)

dan penampak noda lampu UV₂₅₄ nm, ekstrak metanol daun kemuning memperlihatkan 6 noda yang berfluoresensi, hal ini memberikan informasi bahwa terdapat lebih dari satu jenis senyawa flavonoid pada daun kemuning. Serta kalau dilihat dari manfaat tanaman kemuning sebagai obat tradisional maka sangat berpotensi untuk diteliti maka penting dilakukan penelitian ini.

2. Metode Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas yang lazim digunakan di laboratorium kimia organik, alat destilasi, rotary evaporator, kolom kromatografi, spektrofotometer UV, spektrofotometer IR, Fisher John Melting Point Apparatus, lampu UV₂₅₄ nm, pipet mikro, kapiler, vial, botol camber, tempat penetasan udang laut dan aerator.

Bahan-bahan yang digunakan adalah etanol, n-heksana, kloroform, metanol, etil asetat, serbuk magnesium, asam klorida pekat, natrium hidroksida, uap iodium, plat KLT silika gel 60 GF 254, silika gel 60 (230-400 mesh), kapas, kertas saring, aquades, telur *Artemia salina* Leach.

a. Persiapan Sampel

Sampel berupa daun tanaman kemuning diambil di kelurahan Bentiring, kota Bengkulu kemudian determinasi tumbuhan dilakukan di Herbarium Universitas Andalas Padang (ANDA).

b. Uji Pendahuluan Flavonoid

Identifikasi kandungan flavonoid dilakukan dengan cara: lebih kurang 4 g sampel dipanaskan dengan metanol 10 mL kemudian disaring. Filtrat ditambah 3 tetes asam klorida pekat, kemudian ditambahkan serbuk logam magnesium. Kalau timbul warna merah atau jingga berarti positif mengandung flavonoid. Sebagai pembanding digunakan daun legundi (*Vitex trifolia*) dengan perlakuan yang sama. Dimana legundi mempunyai kadar relatif 0,05 % dengan lambang ++.

c. Isolasi Senyawa Flavonoid dengan Tuntunan Bioassay

Sampel daun kemuning yang telah dikumpulkan dirajang halus kemudian dikering anginkan. Setelah kering, sebanyak 800 g sampel disoklet terlebih dahulu menggunakan pelarut n-heksana. Ekstrak yang didapat diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator*, maka akan diperoleh ekstrak pekat fraksi n-heksana. Terhadap Ekstrak pekat n-heksana dilakukan uji kandungan senyawa flavonoid dan uji *Brine Shrimp*. Setelah proses ekstraksi dengan n-heksana selesai maka proses sokletasi ini dilanjutkan dengan menggunakan pelarut metanol. Ekstrak metanol di pekatkan *in vacuo*, maka akan diperoleh ekstrak pekat fraksi metanol. Terhadap ekstrak pekat metanol juga dilakukan deteksi senyawa flavonoid dan uji *Brine shrimp*.

Ekstrak yang positif mengandung senyawa flavonoid dan aktif dengan “*Brine Shrimp*” dilanjutkan dengan kromatografi kolom menggunakan silika gel sebagai fasa diam dengan sistem *step gradient polarity*. Sebagai eluen digunakan campuran n-heksana dengan etil asetat, etil asetat : metanol dan dilanjutkan dengan metanol. Fraksi yang keluar dari kolom ditampung dengan vial/tabung reaksi dan dimonitor dengan kromatografi lapisan tipis (KLT) dengan eluen campuran etil asetat dan metanol dengan perbandingan 9 : 1. Fraksi yang memberikan noda dan R_f yang sama

di gabung, diuapkan pelarutnya. Untuk mengetahui jumlah noda pada plat, maka plat disinari dengan lampu UV₂₅₄ nm dan juga menggunakan uap I₂.

d. Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi

Senyawa murni hasil isolasi ditentukan dahulu sifat fisiknya meliputi uji titik leleh dan kromatografi lapis tipis dengan berbagai macam eluen, dihitung LC₅₀ dengan metoda *Brine Shrimp* untuk menentukan keaktifan biologisnya. Setelah itu baru di rekam spektrum UV dan spektrum IR.

e. Uji Aktifitas Biologis (Bioassay) fraksi n-Heksana, fraksi Metanol dan senyawa Hasil Isolasi

Masing-masing fraksi (fraksi n-heksana, fraksi metanol) dan juga senyawa murni dilakukan uji aktivitas Sitotoksik dengan metoda *Brine shrimp* menggunakan anak udang air laut (*Artemia salina* Leach), dengan cara disiapkan 9 vial untuk tiga konsentrasi masing-masing larutan uji 1000, 100, 10 µg/ml serta satu vial untuk kontrol. Larutan induk dibuat dengan melarutkan 20 mg sampel uji dalam 2 ml metanol. Larutan induk tersebut sebanyak 500, 50,5 µl berturut-turut dimasukkan kedalam masing-masing vial yang telah disiapkan untuk konsentrasi 1000, 100, 10 µg/ml. Vial yang berisi larutan uji dikeringkan dalam desikator sampai semua pelarutnya menguap, kemudian ditambahkan 50 µl DMSO termasuk vial kontrol untuk melarutkan sampel kembali. Selanjutnya ditambah 2 ml air laut. Larva *Artemia salina* Leach sebanyak 10 ekor dimasukkan kedalam setiap larutan uji dan kontrol, dicukupkan volumenya sampai 5 ml dengan air laut, diletakkan dibawah sinar lampu selama 24 jam. Setelah 24 jam diamati dan dihitung jumlah larva udang yang mati. Dari data yang diperoleh, dihitung nilai LC₅₀ nya dengan analisis probit atau program komputer Finney [6][9].

3. Hasil Dan Pembahasan

a. Ekstraksi Daun Kemuning

Identifikasi tumbuhan yang telah dilakukan di Herbarium Universitas Andalas Padang (ANDA)

menunjukkan nama species dari tumbuhan ini adalah *Murraya paniculata* L. Jack. Hasil pemeriksaan kandungan senyawa flavonoid dari daun tumbuhan ini memperlihatkan hasil (++) dengan pereaksi sianidin. Hasil ekstraksi 800 g sampel kering daun *Murraya paniculata* L. Jack. diperoleh ekstrak kental fraksi n-heksana sebanyak 4,6 g dan ekstrak kental fraksi metanol sebanyak 18,2 g. Uji pendahuluan kandungan senyawa flavonoid dengan KLT dan sianidin test terhadap fraksi n-heksana menunjukkan hasil yang negatif. Uji pendahuluan dengan sianidin test dan KLT menggunakan penampak noda lampu UV₂₅₄ nm terhadap fraksi metanol menunjukkan hasil uji positif, dengan KLT memberikan noda-noda dengan warna fluoresensi biru, kuning-hijau, ungu dan biru-ungu yang terpisah baik dengan eluen etil asetat-metanol (9:1). Dari data ini diperoleh informasi bahwa selain mengandung senyawa flavonoid fraksi metanol ini juga mengandung senyawa kumarin.

b. Uji Aktifitas Biologis (Bioassay) Fraksi n-Heksana Dan Fraksi Metanol

Setelah didapat ekstrak fraksi n-heksana dan ekstrak fraksi metanol, maka dilanjutkan dengan uji *Brine shrimp Lethality Test* (BSLT) untuk mencari fraksi yang paling aktif yang dilihat dari harga LC₅₀, dengan hasil sebagai berikut:

Tabel 1. Hasil Uji Hayati *Brine Shrimp Lethality Test* Ekstrak Daun Kemuning

Jenis Ekstrak	LC ₅₀ (µg/ml)
Fraksi n-heksana	6375
Fraksi Metanol	707,64

Fraksi metanol positif mengandung flavonoid dengan test sianidin dan juga mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap *Arthemiasalina* yang ditunjukkan dengan LC₅₀ < dari 1000 µg/ml, maka fraksi metanol sangat berpotensi untuk dieksplorasi lebih lanjut sehingga didapatkan senyawa murni. Sedangkan fraksi n-heksana tidak mengandung flavonoid dan tidak mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap *Arthemiasalina* yang ditunjukkan dengan LC₅₀ besar dari 1000 µg/ml, sesuai dengan yang dilaporkan oleh Meyer *et al.*, 1982 bahwa ekstrak suatu tumbuhan mempunyai

aktivitas sitotoksik jika memberikan LC₅₀ ≤ dari 1000 µg/ml, maka fraksi n-heksana tidak dilanjutkan.

c. Isolasi Flavonoid dari Fraksi Metanol dengan Kromatografi Kolom

Fraksi metanol positif mengandung senyawa flavonoid dan aktif dengan “Brine Shrimp” dilanjutkan dengan kromatografi kolom. Sebanyak 1 gram ekstrak pekat fraksi metanol dikromatografi kolom menggunakan silika gel sebagai fasa diam dan elusi bergradient menggunakan eluen campuran n-heksana-etil asetat, etil asetat- metanol dan metanol. Fraksi yang keluar dari kolom ditampung dengan vial/tabung reaksi dan dimonitor dengan kromatografi lapisan tipis dengan eluen campuran etil asetat-metanol dengan perbandingan 9 : 1, didapat 16 (enam belas) fraksi gabungan. Spot yang terlihat pada KLT dibawah lampu UV memperlihatkan fluoresensi yang menunjukkan adanya konyugasi fenolik, diduga adanya senyawa flavonoid. Ini konsistensi dengan penapisan fitokimia yang menunjukkan adanya senyawa flavonoid pada daun kemuning. Fraksi 13 positif mengandung flavonoid, memberikan satu noda yang berfluoresensi kuning dengan KLT kemudian pelarutnya diuapkan dan direkristalisasi dengan metanol. Setelah pelarutnya menguap maka diperoleh kristal jarum berwarna kuning pucat sebanyak 30 mg.

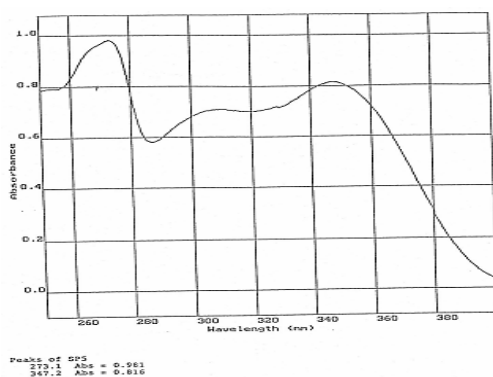
d. Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi

Senyawa hasil isolasi yang didapat diuji terlebih dahulu dengan sianidin test untuk memastikan bahwa kristal yang didapat adalah flavonoid, setelah diuji dengan pereaksi sianidin memperlihatkan larutan uji berwarna merah, artinya kristal yang didapat positif flavonoid, didukung oleh data KLT yang memberikan satu noda berfluoresensi kuning, hal ini menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi ini benar-benar flavonoid. Untuk memastikan bahwa senyawa flavonoid hasil isolasi ini sudah murni maka dilakukan uji titik leleh (TL) terhadap senyawa hasil isolasi diperoleh TL 195-196° C. Jarak titik leleh sebesar 1° C ini menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi ini sudah murni. Hal ini ditunjang pula oleh data KLT dengan beberapa eluen yang tetap memberikan satu noda, dengan pengungkap noda lampu UV₂₅₄ nm dan uap I₂ dengan R_f yang

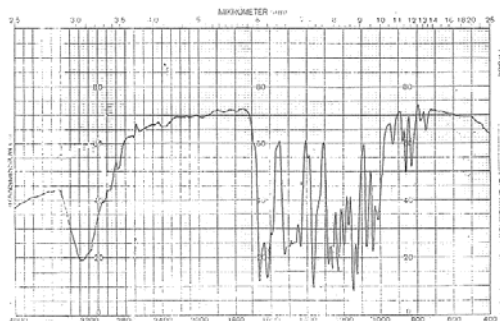
dicantumkan pada tabel 2. Oleh sebab itu untuk selanjutnya dapat dilakukan karakterisasi dengan spektrum UV dan IR.

Tabel 2. Hasil Pengujian Kromatografi Lapisan Tipis Senyawa Hasil Isolasi Dengan Berbagai Eluen Dan Penampak Noda

NO.	Eluen	Rf	Pengamatan Dengan Penampak Noda		
			Lampu UV _{254nm}	NaOH 10% + lampu UV _{254nm}	Uap I ₂
1.	n-heksana	0,00	Satu noda berfluoresensi kuning	Satu noda fluoresensi kuning terang	Satu noda coklat
2.	Kloroform	0,10	Satu noda berfluoresensi kuning	Satu noda fluoresensi kuning terang	Satu noda coklat
3.	Etil asetat	0,14	Satu noda berfluoresensi kuning	Satu noda fluoresensi kuning terang	Satu noda coklat
4.	metanol	0,72	Satu noda berfluoresensi kuning	Satu noda fluoresensi kuning terang	Satu noda coklat



Gambar 1. Spektrum Ultraviolet Senyawa Hasil Isolasi



Gambar 2. Spektrum Infrared Senyawa Hasil Isolasi

Senyawa hasil isolasi yang dikarakterisasi dengan spektrofotometer UV mempergunakan pelarut metanol memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 273,1 nm (pita II) , 305 nm (bahu) dan 347,2 nm (pita I) terlihat pada lampiran 1. Interpretasi spektrum UV mendukung data sebelumnya bahwa senyawa hasil isolasi ini adalah flavonoid, dimana menurut Markham (1988), flavon (apigenin) mempunyai spektrum UV pada pita II dengan λ maks 250-280 nm dan pita I dengan λ maks 310-350. Serapan yang menyebabkan terjadinya pita II karena adanya eksitasi elektron dari π ke π^* pada cincin benzenoid (cincin B). Pita I dihasilkan karena adanya transisi elektronik dari n ke π^* pada gugus karbonil yang terkonyugasi oleh cincin A.

Karakterisasi senyawa hasil isolasi dengan spektrofotometer IR memberikan serapan pada angka gelombang $\nu^{KBr}_{Maks} \text{ cm}^{-1}$: 3260, 1660, 1620, 1520, 1440, 1365, 1285, 1260, 1225, 1200, 1175, 1145, 1125, 1080, 1040, 1010, 940, 860, 835, 780 dan 745. Interpretasi spektrum inframerah didapatkan puncak-puncak yang penjabarannya sebagai berikut: serapan pada angka gelombang 3260 cm^{-1} merupakan serapan OH fenol yang mempunyai ikatan hidrogen [11]. Cincin aromatis ditunjukkan oleh puncak yang muncul pada daerah $1650\text{-}1450 \text{ cm}^{-1}$, senyawa hasil isolasi memberikan puncak sekitar 1620 cm^{-1} dan 1520 cm^{-1} yang merupakan regangan C=C aromatis dan didukung oleh pita serapan pada 860 cm^{-1} , 835 cm^{-1} , 940 cm^{-1} serta pada daerah 1440 cm^{-1} terdapat pita yang sangat kuat dan tajam yang merupakan regangan cincin aromatis [3].

Senyawa hasil isolasi memperlihatkan serapan pada angka gelombang 1660 cm^{-1} yang mengindikasikan serapan untuk gugus karbonil C=O, didukung oleh puncak 1145 cm^{-1} . Menurut literatur regang C=O yang karakteristik untuk senyawa-senyawa flavonoid adalah $1700\text{-}1750 \text{ cm}^{-1}$ yang didukung oleh adanya puncak pada daerah sidik jari dengan angka gelombang 1158 cm^{-1} . Serapan karbonil senyawa hasil isolasi ini lebih kecil karena adanya konyugasi ikatan rangkap. Senyawa karbonil disini adalah golongan ester yang diperkuat oleh puncak-puncak yang kuat pada daerah $1300\text{-}1000 \text{ cm}^{-1}$ [3][11].

e. Aktivitas Sitotoksik Senyawa Murni Hasil Isolasi

Uji Aktivitas sitotoksik dengan metoda *Brine Shrimp Lethality Test* terhadap senyawa murni hasil isolasi memberikan LC₅₀ 194,786 µg/ml. Artinya senyawa murni hasil isolasi ini tidak memberikan efek toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach [1] [4] [13].

4. Kesimpulan

Dari 1 gram fraksi metanol ekstrak daun kemuning, didapat senyawa flavonoid golongan flavon (apigenin) berupa kristal berwarna kuning muda dari daun kemuning dengan titik leleh (195-196° C). Dari hasil uji *Brine Shrimp Lethality Test* terhadap senyawa ini tidak memberikan efek toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan LC₅₀ 194,786 µg/ml.

Ucapan Terima Kasih

Bersamaan dengan publikasi hasil penelitian ini, kami mengucapkan terima kasih kepada DITJEN DIKTI atas bantuan dana penelitian dosen muda tahun 2006.

Daftar Pustaka

- [1] Alen Y., N.E.Putri, Zulharmita, **2004**, Flavonoid Luteolin dari tangkai bunga *Paspalum conjugatum* Berg., *Jurnal matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam*, Unad., NO. 1, Vol.3, hal.38-41.
- [2] Barik, B.R., **1983**, Murrayatin, A Coumarin from *Murraya exotica*, *Phytochemistry*, 22 (10), pp. 2273-2275.
- [3] Creswell, C.J., Olaf, A.R., Malcom, M.C., **1982**, *Analisis Spektrum Senyawa Organik*, ITB Bandung.
- [4] Dey P.M and J.B. Harborne, **1991**, *Method in Plant Biochemistry*, Academic Press, London, 8-10.
- [5] Ibrahim, S., M.Adfa, A.Napis, **1999**, Isolasi Kumarin dari daun Kemuning (*Murraya panicullata* L.Jack), *Andalas Chemistry Journal*, Unand., Vol.5, No. 2, hal 110-114.
- [6] Koestoni T., **1985**, *Analisis Probit*, Balai Penelitian Hortikultura Lembang, Lembang.
- [7] Kusuma H.W., **1990**, *Tanaman Berkhasiat Obat di Indonesia*, Jilid II, Jakarta, hal. 86-87.
- [8] Markham, K.R., 1988, Cara Mengidentifikasi Flavonoid, ITB Bandung
- [9] Meiyanto, E. And Sugianto, **1997**, Uji Toksisitas Beberapa Fraksi Ekstrak Etanol daun *Gymura Procumbens* (Lour) Merr . terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach, *Majalah Farmasi Indonesia*, 8: 42-49.
- [10] Meyer B.N, N.R. Ferrigni, J.E. Putman, L.B. Jacobson, D.E. Nichole and C.L. Mclaughin, **1982**, *Brine Shrimp*

A Convenient General Bioassays For Active Plant Constituents, *Planta Med.*, 45, 31-34.

- [11] Silverstein, R.M., Clayton, B.G., Torence, C.M., **1991**, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, Inc.
- [12] Shung Wu, Jian, **1981**, Omphamurin A New Coumarin from *Murraya omphalocarpa*, *Phytochemistry*, 20, pp. 178-179.
- [13] Solis P.N., C.W. Wright M.M. Anderson, M.P. Gupta & D. Philipson, **1993**, A Microwell Cytoxoxo Assay Using *Artemia salina* Leach, *Planta Med.* 59: 250-252.