

**UJI TOKSISITAS EKSTRAK ETANOL : BUAH, BIJI, DAUN
MAKUTADEWA (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) TERHADAP
Artemia salina Leach DAN PROFIL KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS
EKSTRAK AKTIF**

**TOXICITY OF ETHANOLIC EXTRACT OF FRUIT, SEED AND LEAVES OF
MAKUTADEWA (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) TO
Artemia salina Leach AND THIN LAYER CHROMATOGRAM PROFILE
OF ACTIVE EXTRACT**

Indah Purwantini, Erna Prawita Setyowati dan Triana Hertiani
Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRAK

Telah dilakukan uji toksisitas ekstrak etanol daun, biji dan buah makutadewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl.) dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST). Ekstrak etanol dibuat dengan maserasi bahan-bahan yang diteliti selama 24 jam. Uji dilakukan dengan menggunakan larva *Artemia salina* Leach yang berumur 48 jam. Efek toksisitas diukur dengan menentukan prosentase kematian larva, kemudian dihitung harga LC_{50} tiap ekstrak dengan menggunakan analisa Probit.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa daun, biji dan buah makutadewa bersifat toksik terhadap larva anak udang. Ekstrak etanol biji makutadewa mempunyai aktivitas terbesar dengan harga LC_{50} sebesar $1,60 \times 10^{-2}$ $\mu\text{g/ml}$. Harga LC_{50} ekstrak etanol buah makutadewa sebesar 30,42 $\mu\text{g/ml}$.

Untuk melihat kandungan senyawa pada ekstrak paling aktif digunakan kromatografi lapis tipis. Kromatogram menunjukkan bahwa pada ekstrak tersebut mengandung senyawa golongan alkaloid.

Kata kunci: toksisitas, makutadewa, BST

ABSTRACT

A research has been done to determine the toxicity of ethanolic extract of fruit, seed and leaves of makutadewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl.) using *Brine Shrimp Lethality Test* method. Extract were made by maceration of the materials for 24 hours. The bioassay has been done using 48 hour old *Artemia salina* Leach. The effect of ethanolic extract was identified by determining and analysing the shrimp death percentage and LC_{50} of each extract using probit analysis.

The result showed that these ethanolic extract were toxic to the shrimp. The ethanolic extract of seed was the most active with the LC_{50} of 1.60×10^{-2} $\mu\text{g/ml}$, whereas that of the fruit has the LC_{50} of 30.42 $\mu\text{g/ml}$. The thin layer chromatogram profile of the active extract suggested that the extract contains alkaloids.

Key words : toxicity, makutadewa, brine shrimp lethality test

PENDAHULUAN

Saat ini penyakit kanker menempati urutan kedua sebagai penyebab kematian setelah penyakit jantung. Usaha penyembuhan dengan obat kanker yang ada saat ini kurang memuaskan selain efek samping yang besar, harga yang mahal dan sulit diperoleh. Hal tersebut mendorong dilakukannya pencarian sumber baru senyawa antikanker dari alam.

Phaleria macrocarpa (Scheff.) Boerl. termasuk dalam divisi Spermatophyta, sub divisi Angiospermae, kelas Dycotyledonae, bangsa Celastrales, suku Thymelaceae, dan marga Phaleria. Tanaman

ini di daerah Melayu dikenal sebagai buah simalakama, sedangkan di daerah Jawa dikenal sebagai makuta-dewa. 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 sitotoksik yaitu daphnerotin dan daphnetoksin (Duke, 2001). Seperti diketahui bahwa uji aktivitas antikanker didasarkan adanya efek pada sel (sitotoksik), dengan demikian diharapkan dalam buah, biji dan daun tanaman ini juga terdapat senyawa sitotoksik.

Metode *Brine Shrimp Lethality test* menggunakan hewan uji larva udang *Artemia salina* Leach merupakan salah satu metode yang banyak digunakan untuk pencarian senyawa antikanker baru yang berasal dari tanaman. Metode ini merupakan metode yang cukup praktis, cepat, mudah, murah dan akurat. 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 (Mc. Laughin dan Ferrigni, 1983). Metode ini dilakukan dengan menentukan besarnya LC_{50} selama 24 jam, dan menggunakan volume media atau air laut sebanyak 5 ml dengan jumlah cuplikan sekitar 50 mg untuk suatu ekstrak tanaman (Meyer *et al.*, 1982).

Dengan demikian sebagai uji pendahuluan aktivitas antikanker dari buah, biji dan daun *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. dilakukan uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Untuk mengetahui kemungkinan senyawa yang bertanggungjawab terhadap aktivitas tersebut dilakukan identifikasi menggunakan profil kromatografi lapis tipis.

METODOLOGI

Bahan yang digunakan adalah buah, biji dan daun makutadewa *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. yang telah dideterminasi di Laboratorium Farmakognosi, Jurusan Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, etanol p.a., air laut buatan, lempeng aluminium silika gel GF₂₅₄, ragi kering, silika gel pengering, yellow tip, pipa kapiler, aluminium foil, akuadestilata.

Alat yang digunakan adalah alat untuk uji BST yaitu aerator dan bak uji, serta alat KLT.

CARA KERJA

Uji BST

Penyiapan sampel

Seratus mg ekstrak etanol buah, biji dan daun makutadewa yang telah kering dilarutkan ke dalam 20 ml metanol. Kemudian diambil sebanyak 10, 200, 400, 800, 1600 dan 3200 μ l dan dimasukkan ke dalam flakon kemudian diuapkan sampai kering. Sebagai kontrol digunakan pelarut metanol, diperlakukan sama dengan di atas. Setiap konsentrasi dibuat replikasi 6 kali.

Penetasan telur udang

Telur udang ditetaskan dalam wadah kaca berisi air laut. Suatu pembatas dari plastik dengan beberapa lubang berdiameter 2 mm digunakan untuk membuat dua kompartemen, yaitu kompartemen gelap dan kompartemen terang. Kompartemen terang dibuat dengan bantuan penerangan lampu sedangkan kompartemen gelap dibuat dengan cara menutup kompartemen tersebut dengan kertas gelap. Telur sebanyak 50 mg ditempatkan dalam kompartemen gelap, 48 jam kemudian larva udang yang berada di kompartemen terang diambil dengan menggunakan pipet tetes.

Uji toksisitas

Sepuluh ekor larva udang dipindah ke dalam masing-masing flakon yang berisi sampel maupun kontrol pelarut, kemudian ditambahkan air laut sampai volume mencapai 5 ml. Kemudian ditambahkan 1 tetes suspensi ragi (3 mg dalam 5 ml air) ke dalam tiap flakon, dibiarkan selama 24 jam. Jumlah larva udang yang mati dalam waktu 24 jam tersebut kemudian dihitung. Bila ada kematian pada kontrol, dikoreksi dengan rumus Abbot's:

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{Tes - kontrol}}{\text{kontrol}} \times 100\%$$

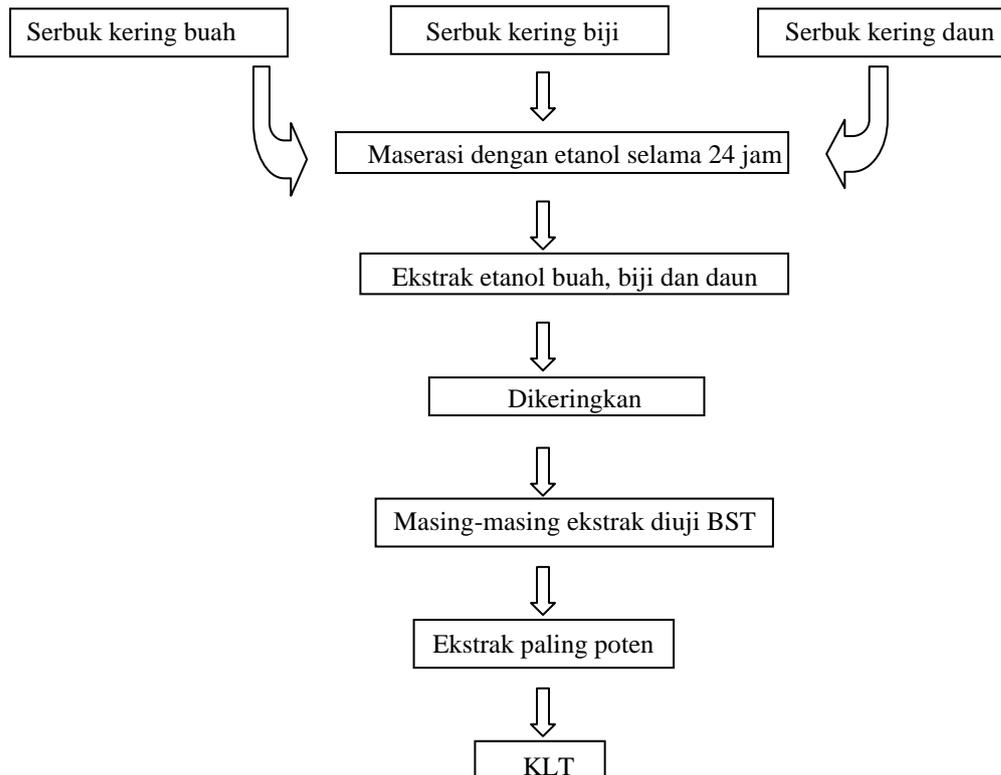
Profil Kromatografi Lapis Tipis

Fraksi yang paling poten (LC_{50} paling kecil) diuji dengan KLT dan diperiksa kandungan kimianya menggunakan pereaksi yang sesuai untuk kandungan senyawa polifenol, saponin, terpen dan alkaloid.

Analisis Hasil

Data berupa prosentase kematian dari masing-masing konsentrasi ekstrak dianalisis *probit* sehingga diperoleh harga LC_{50} .

Skema Kerja



Gambar 1. Diagram alur penelitian

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstrak yang diuji toksisitasnya adalah ekstrak etanol buah, biji dan daun makutadewa yang diperoleh dengan cara maserasi. Masing-masing ekstrak yang telah kering dilarutkan ke dalam metanol, kemudian metanol diuapkan sampai kering.

Untuk penetasan telur digunakan air laut yang diencerkan dengan akuadestilata 1:1 sehingga diharapkan air yang digunakan untuk media penetasan mempunyai kadar garam sekitar 15 per mil. Pada kadar garam tersebut diharapkan akan dicapai hasil penetasan yang baik, karena apabila digunakan air berkadar garam tinggi setelah telur menetas harus segera dipindahkan ke dalam air yang berkadar garam rendah. Hal ini dilakukan karena pada kadar garam yang tinggi tekanan osmosis di dalam telur lebih rendah daripada lingkungan sekitarnya sehingga apabila tidak dipindahkan embrio akan mati. Dengan air laut berkadar garam 15 per mil maka embrio tidak perlu dipindahkan ke dalam air yang bertekanan osmosis rendah. Untuk memenuhi kadar oksigen yang terlarut digunakan aerator dengan kekuatan aerasi sedang

sehingga gelembung udara ini juga berfungsi untuk mengaduk telur secara merata sehingga telur tidak mengendap dan jika ini terjadi maka telur akan sulit menetas karena kekurangan oksigen.

Larva yang digunakan berumur 48 jam karena pada umur tersebut larva paling peka disebabkan dinding selnya masih lunak. Untuk menimbulkan efek yang dapat diamati diperlukan konsentrasi rendah, selain itu waktu percobaan yang diperlukan pun lebih singkat. Hasil uji toksisitas ekstrak etanol buah, biji dan daun makutadewa dipaparkan pada tabel I, II, dan III.

Tabel I. Jumlah larva *Artemia salina* Leach yang mati/10 larva karena pengaruh ekstrak etanol buah makutadewa setelah waktu 24 jam

Konsentrasi (µg/ml)	Jml larva udang yang mati tiap flakon					Purata + SD	Prosentase kematian
	1	2	3	4	5		
100	10	9	10	10	9	9,6 ± 0,5	96 ± 5
80	8	8	7	7	8	7,6 ± 0,5	76 ± 5
40	5	5	4	5	4	4,8 ± 0,5	48 ± 5
20	2	4	3	2	4	3,0 ± 0,9	30 ± 9
4	2	2	2	2	0	1,6 ± 0,8	16 ± 8
Kontrol pelarut	0	0	0	0	0	0	0

Tabel II. Jumlah larva *Artemia salina* Leach yang mati/10 larva karena pengaruh ekstrak etanol biji makutadewa setelah waktu 24 jam

Konsentrasi (µg/ml)	Jml larva udang yang mati tiap flakon					Purata + SD	Prosentase kematian
	1	2	3	4	5		
1	10	10	10	10	9	9,8 ± 0,4	98 ± 4
0,2	9	9	7	9	9	8,6 ± 0,8	86 ± 8
0,04	6	6	7	5	6	6,0 ± 0,6	60 ± 6
0,008	0	4	3	3	3	2,6 ± 1,3	26 ± 13
0,0016	3	4	2	2	1	2,4 ± 1,0	24 ± 10
Kontrol pelarut	0	0	0	0	0	0	0

Tabel III. Jumlah larva *Artemia salina* Leach yang mati/10 larva karena pengaruh ekstrak etanol daun makutadewa setelah waktu 24 jam

Konsentrasi (µg/ml)	Jml larva udang yang mati tiap flakon					Purata + SD	Prosentase kematian
	1	2	3	4	5		
300	7	6	6	5	4	5,6 ± 1,0	56 ± 10
250	5	8	5	6	7	6,2 ± 1,2	62 ± 12
200	3	5	4	4	1	3,8 ± 1,3	38 ± 13
Kontrol pelarut	0	0	0	0	0	0	0

Hasil uji menggunakan metode BST dari ekstrak etanol biji makutadewa pada konsentrasi 1 µg/ml menunjukkan prosentase kematian larva udang hampir mencapai 100% (98%), sedangkan pada ekstrak etanol buah makutadewa membutuhkan konsentrasi di atas 100 µg/ml dan ekstrak etanol daun di atas 300 µg/ml.

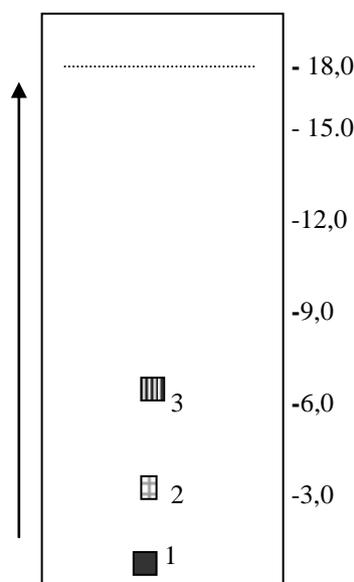
Dari tabel terlihat bahwa ekstrak etanol buah, biji dan daun makutadewa mempunyai efek toksik yang berlainan terhadap larva udang. Hal ini dapat terlihat dari perbedaan konsentrasi ekstrak yang mampu membunuh larva udang. Karena pada perlakuan kontrol tidak terlihat adanya kematian larva udang, maka koreksi dapat diabaikan pada perhitungan prosentase kematian. Analisa *probit* menggunakan program statistik SPSS untuk mendapatkan harga LC₅₀ hanya dilakukan pada ekstrak biji dan buah makutadewa sedangkan pada daun tidak dilakukan karena uji pada daun hanya dilakukan menggunakan 3 macam kadar yang berlainan. Dari hasil analisis (tabel IV) terlihat bahwa toksisitas ekstrak etanol biji makutadewa jauh lebih besar dibandingkan dengan ekstrak buah makutadewa.

Tabel IV. Harga LC₅₀ ekstrak etanol biji dan buah makutadewa.

Jenis ekstrak	LC ₅₀ (µg/ml)	Rata-rata LC ₅₀ (µg/ml)
Biji	0,00922 0,00816 0,01908 0,01912 0,02427	$1,60 \times 10^{-2} \pm 0,62 \times 10^{-2}$
Buah	26,74 26,24 31,52 26,74 40,86	$30,42 \pm 5,56$

Semakin besar harga LC₅₀ maka senyawa tersebut makin tidak toksik. Dari data di atas diketahui bahwa harga LC₅₀ untuk ekstrak etanol biji makutadewa adalah $1,60 \times 10^{-2}$ µg/ml sedangkan ekstrak etanol buah makutadewa adalah 30,42 µg/ml. Kedua ekstrak tersebut dapat dikatakan bersifat toksik karena menurut Meyer *et al.*, (1982) suatu senyawa dikatakan toksik jika mempunyai harga LC₅₀ kurang dari 1000 µg/ml. Dari data di atas dapat disimpulkan bahwa ekstrak biji makutadewa lebih toksik dibandingkan ekstrak buah makutadewa.

Hasil kromatografi lapis tipis (Gambar 2. dan Tabel IV) adalah yang dilakukan terhadap ekstrak biji makutadewa.



Gambar 2. Kromatogram dengan pereaksi Dragendorff untuk mendeteksi alkaloid
Fase diam: silika gel GF₂₅₄, Fase gerak : kloroform : aseton (10:1,5)

Tabel V. Hasil KLT ekstrak etanol biji makutadewa

No bercak	Harga Rf	Dragendorf	SbCl ₃	Serium (IV) sulfat
1	Awal	-	-	-
2	0,25	coklat	-	-
3	0,3	coklat	-	-

Dari tabel V terlihat bahwa pada ekstrak etanol biji makutadewa mengandung senyawa alkaloid yang terlihat pada bercak pada nomer 2 dan 3, yang ditunjukkan dengan adanya reaksi positif terhadap pereaksi Dragendorf.

KESIMPULAN

Ekstrak etanol buah, biji dan daun makutadewa bersifat toksik menurut metode BST. Ekstrak etanol biji makutadewa mempunyai daya toksisitas paling besar dengan harga LC₅₀ sebesar $1,60 \times 10^{-2}$ µg/ml, sedangkan harga LC₅₀ ekstrak etanol buah makutadewa adalah 30,42 µg/ml. Berdasarkan profil kromatogramnya, ekstrak etanol biji makutadewa mengandung paling sedikit 2 macam senyawa alkaloid.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada yang telah memberikan bantuan dana melalui DIKS tahun 2001.

DAFTAR PUSTAKA

- Djumidi, Sutjipto, Gotama, Sugiarto, S., Nurhadi, M., Widyastuti, Y., Wahyono, S., dan Prapti, I.Y., 1999, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*, 147-148, Ed 5, DepKes RI, Jakarta.
- Duke, J.A., 2001, *Phytochemical and Ethnobotany Databases*, *Daphne mezereum*, L., <http://www.ars-grin.gov/duke/farmacy>.
- 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.