

**FRAKSINASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA ANTIKANKER
EKSTRAK KULIT BATANG *Rhizophora mucronata*
SERTA UJI TOKSISITASNYA TERHADAP LARVA UDANG
(*Artemia salina* Leach)**

Hartiwi Diastuti, Suwandri

Program Studi Kimia, Jurusan MIPA

Fakultas Sains dan Teknik, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto

ABSTRACT

Investigation the anticancer potency of *R. mucronata* has not been carried yet. This research were aimed to extract the bioactive compound of *R. mucronata* with various organic solvents, examine their toxicity againts *A. salina* Leach larv. and identify the toxic compounds from *R. mucronata* steam bark.

The extraction of *R. mucronata* steam bark were peformed by maseration with n-hexane, chloroform, ethylacetate and methanol, repectively. The extracts were examined their toxicity againts *A. salina* Leach larv. The highest activity extracts was fractionated performed by coloumn chromatography. The fractions respectively was examined their toxicity againts *A. salina* Leach larv. Identification of toxic compound was carry out using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

The chloroform extracts of *R. mucronata* had toxic character. Toxicity test to *A. salina* Leach larv. The Result showed that the chloroform fraction 1 (C1) of *R. mucronata* steam bark had LC₅₀ equal to 301.50 ppm. Phytochemical study showed that the active fractions contained terpenoid. Bioactive compound from *R. mucronata* steam bark were dioctyl phthalate and cyclopropyle azulene decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene.

Keywords : *R. mucronata* steam bark, anticancer, *Artemia salina* Leach.

PENDAHULUAN

Tumbuhan mangrove yang menempati kurang lebih 4 juta hektar wilayah Indonesia, merupakan sumber bahan obat tradisional yang dapat digunakan sebagai sumber senyawa bioaktif diantaranya golongan tanin, saponin, terpenoid, alkaloid dan steroid dengan aktivitas sebagai anti mikroba, antifungi, antivirus, antitumor, insektisida dan antileukemia (Soetarno, 2000 dan Ranutriwijaya, 1994). Pemanfaatan tanaman mangrove sebagai bahan obat tradisional telah lama digunakan oleh masyarakat dalam terapi penyakit gastroenteritis dan anti kanker. Bagian tumbuhan yang dapat digunakan sebagai anti kanker adalah kulit batang, akar, daun, bunga dan buah (Saputra,2000).

Tumbuhan mangrove juga menempati sekitar 15.000 hektar wilayah pantai Cilacap yang sebagian besar belum dikaji potensinya secara ilmiah. Salah satu famili tanaman mangrove yang tumbuh di pantai Cilacap yang diketahui berpotensi sebagai tananam obat adalah famili Rhizophoraceae. Warsinah, *et al*, (2005) melaporkan hasil penelitiannya tentang ekstrak etanol kulit batang *B. gymnorrhiza* yang mampu menghambat pertumbuhan sel kanker Hela dengan nilai LC₅₀ sebesar 301,78 µg/ml dan sel Myeloma dengan LC₅₀ sebesar 582 µg/ml secara *invitro*. Ningsih, *et al*, (2006) dalam penelitiannya melaporkan adanya aktivitas antimikroba pada tanaman *Rhizophora mucronata*. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa tanaman

yang diketahui memiliki aktivitas antimikroba, berpotensi pula sebagai antikanker, karena diduga toksisitas yang dimilikinya dapat pula bekerja pada fase tertentu dari siklus sel kanker (Lisdawati, 2002).

Ghosh *et. al* (1985) melaporkan adanya senyawa steroid, triterpenoid, alkaloid, flavonoid, tanin, katekat, kuinon dan antosianidin pada tanaman *R. mucronata*. Uji toksisitas ekstrak kulit batang *R. Mucronata* terhadap larva instar V *H. Armigera* yang dilaporkan oleh Nursal dan Pasaribu (2003) diketahui bahwa ekstrak etanol kulit batang *R. Mucronata* memiliki LC_{50} 3,22% pada suhu 30°C dan LC_{50} 2,10% pada suhu 24°C. Uji toksisitas tersebut menunjukkan bahwa kulit batang *R. Mucronata* dapat digunakan sebagai insektisida.

Kanker merupakan salah satu ancaman utama di bidang kesehatan. Usaha penyembuhan kanker dengan obat (farmakoterapi) atau dengan senyawa kimia (khemoterapi) pada umumnya belum mampu memberikan hasil yang memuaskan, sehingga diupayakan cara-cara pengobatan alternatif antara lain dengan obat tradisional (Ma'at, 2004). Cara pengobatan dengan menggunakan tanaman obat tradisional tersebut umumnya belum mempunyai dasar rasional baik secara laboratoris maupun klinis.

Penelitian terhadap tumbuhan mangrove famili Rhizophoraceae, di antaranya pada spesies *R. mucronata* belum banyak dilaporkan, terutama kajian senyawa kimianya yang berpotensi sebagai antikanker. Penelitian ini dimaksudkan untuk melakukan uji pendahuluan terhadap ekstrak kulit batang *R. mucronata* tentang potensinya sebagai antikanker dengan metode uji kematian larva udang (*Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)). Penelitian dilakukan dengan cara mengekstraksi kulit batang *R. Rhizophora* dengan

metanol kemudian difraksinasi dengan beberapa pelarut yang berbeda kepolarannya (n-heksana, kloroform, dan etil asetat) serta menguji toksisitas setiap fraksi ekstrak sampel secara *in vitro* terhadap larva udang (*Artemia salina* Leach).

Manfaat penelitian ini adalah memberikan landasan ilmiah mengenai potensi anti kanker ekstrak kulit batang *R. mucronata*. Penemuan obat antikanker dengan agen fitoterapi menjadi penting artinya, karena dapat memberikan alternatif terapi dengan biaya yang jauh lebih murah dan seringkali memiliki efek samping yang lebih kecil.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit batang *R. mucronata* dari pantai Tritih Cilacap Jawa Tengah, larva udang *A. salina* Leach, DMSO (dimetil sulfoksida), metanol, etanol, etil asetat, kloroform, dan n-heksana, silika gel untuk kolom kromatografi, pelat KLT serta kulit udang putih, HCl, NaOH, NaOCl, kultur murni bakteri *S. aureus* ATCC 25293, nutrisi cair (NB), nutrisi padat (NA), akuades dan akuabides.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Alat-alat gelas yang biasa digunakan di laboratorium, kolom kromatografi, *rotary evaporator*, wadah biakan larva *A. salina*, lampu, kain hitam, kawat kassa dan GC-MS.

Prosedur Penelitian

Ekstraksi dan Fraksinasi Serbuk Kulit Batang R. mucronata

Kulit batang segar yang telah dibersihkan dari kotoran yang menempel, dikeringkan di tempat terbuka kemudian digiling halus. Serbuk kering yang diperoleh (500 g) dimaserasi dengan n-heksana selama 48 jam pada suhu kamar. Ekstrak disaring, kemudian pelarutnya diuapkan dengan *rotary evaporator*.

Residu dikeringkan, selanjutnya diekstraksi kembali berturut-turut dengan pelarut kloroform, etil asetat dan metanol. Ekstraksi dengan pelarut bertingkat dimaksudkan untuk mendapatkan atau memisahkan ekstrak tumbuhan berdasarkan polaritas senyawanya.

Masing-masing ekstrak yang terlarut dalam n-heksana, kloroform, etil asetat dan metanol diuapkan pelarutnya. Ekstrak yang telah kering selanjutnya diuji toksisitasnya terhadap larva udang. Ekstrak dari pelarut tertentu yang memiliki toksisitas tertinggi digunakan untuk tahap isolasi dan identifikasi senyawa kimianya.

Ekstrak dari pelarut yang memiliki toksisitas terbesar selanjutnya di kromatografi kolom menggunakan silika gel 60 GF₂₅₄ sebagai penyangga fasa diam. Elusi dilakukan melalui elusi sistem gradien kepolaran dengan eluen yang sesuai. Fraksi hasil kromatografi kolom diuji KLT untuk mengidentifikasi komponen kimia dari setiap fraksi. Setiap fraksi yang sama digabung menjadi satu. Setiap fraksi gabungan diuji toksisitasnya terhadap larva udang *A. salina* Leach. Fraksi dengan aktivitas tertinggi diidentifikasi kandungan senyawa kimianya dengan pereaksi warna dan GC-MS.

Uji Toksisitas dengan Metode Uji Kematian Larva Udang (Dwiatmaka, 2000)

Telur *A. salina* direndam ke dalam aquades selama 1 jam, telur yang tenggelam diambil untuk ditetaskan dalam air laut. Penetasan telur udang dilakukan dalam aquarium yang diberi aerasi selama 48 jam. Aquarium dibagi dua bagian dengan sekat kawat kassa. Satu bagian diberi telur udang dan ditutup dengan kertas karbon sedang bagian yang lain diberi penerangan dengan lampu. Larva akan bergerak dari tempat gelap ke tempat terang. Tabung berisi 10 mL air laut dan ekstrak disiapkan untuk memindahkan larva

sebanyak 10 ekor, kemudian diamati jumlah larva udang yang mati kemudian dilanjutkan dengan penghitungan nilai LC₅₀. Ekstrak uji dibuat dengan konsentrasi 1000, 500, 250, 125 dan 62,5 µg/mL. Beberapa tetes DMSO dapat ditambahkan untuk membantu kelarutan ekstrak yang nonpolar.

Uji Golongan Senyawa Kimia Fraksi Aktif (Harborne, 1987)

Uji flavonoid

Larutan sampel ditambah dengan serbuk magnesium (pereaksi Shinoda) kemudian diberi beberapa tetes HCl pekat. Adanya senyawa flavonoid ditunjukkan dengan timbulnya warna oranye, merah muda dan ungu.

Uji terpenoid

Larutan sampel diteteskan ke dalam larutan Lieberman Buchard. Adanya senyawa terpenoid ditunjukkan dengan timbulnya warna biru, hijau, merah atau oranye.

Uji alkaloid

Larutan sampel ditambah dengan pereaksi Mayer selanjutnya ditambah beberapa tetes asam. Adanya alkaloid ditunjukkan dengan timbulnya endapan putih sampai kekuningan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan Uji Toksisitas Ekstrak Kulit Batang *R. mucronata*

Ekstraksi serbuk kulit batang *R. mucronata* (500 g) dilakukan dengan cara sokletasi berturut-turut menggunakan pelarut n- heksana, kloroform, etil asetat dan metanol. Setiap ekstrak yang diperoleh selanjutnya dikeringkan dengan evaporator. Jumlah ekstrak kering dari kulit batang *R. mucronata* untuk masing-masing pelarut disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil ekstraksi kulit batang *R. mucronata*

Ekstrak	Jumlah ekstrak (g)	Rendemen (%)
n-Heksana	2,31	0,46
Kloroform	3,00	0,60
Etil Asetat	7,47	1,49
Metanol	48,30	9,66

Masing-masing ekstrak diuji toksisitasnya terhadap larva udang *A. salina* Leach untuk mengetahui nilai LC_{50} dari masing-masing ekstrak. Data hasil uji toksisitas selengkapnya disajikan pada Lampiran 1 dan nilai LC_{50} terhadap larva udang dapat dilihat pada Tabel 2 berikut.

Tabel 2. Nilai LC_{50} ekstrak kulit batang *R. mucronata*.

Ekstrak	LC_{50} (ppm)
n-Heksana	3014,98
Kloroform	744,31
Etil Asetat	1876,53
Metanol	1063,41

Hasil uji toksisitas ekstrak n-heksana, kloroform, etil asetat dan metanol berdasarkan data pada Tabel 4.2 di atas menunjukkan bahwa ekstrak kloroform memiliki toksisitas tertinggi yaitu 744,31 ppm dan dinyatakan bersifat toksik serta berpotensi sebagai antikanker karena memiliki nilai LC_{50} kurang dari 1000 ppm. Sedangkan ekstrak n-heksana, etil asetat dan metanol bersifat tidak toksik karena memiliki nilai LC_{50} lebih besar dari 1000 ppm.

Ekstrak kloroform selanjutnya difraksinasi dengan kromatografi kolom menggunakan eluen n-heksan dan kloroform dengan perbandingan bervariasi berdasarkan urutan polaritas, dari polaritas terendah sampai dengan

polaritas tertinggi. Hasil fraksinasi ekstrak kloroform menghasilkan 4 (empat) fraksi utama yaitu fraksi I, II, III dan IV, selanjutnya ke empat fraksi diidentifikasi dengan KLT menggunakan eluen kloroform : metanol = 9 : 1. Noda yang tampak pada KLT dihitung nilai R_f nya, kemudian diidentifikasi dengan lampu UV. Hasil KLT dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil KLT fraksi ekstrak kloroform.

Fraksi	R_f	Warna noda (lampu UV)
I	0,80	Ungu
II	0,80	Ungu
III	0,52	Ungu
IV	0,88	Ungu
	0,88	Ungu

Berdasarkan hasil KLT di atas, fraksi I dan II memiliki nilai R_f dan warna noda yang sama, sedangkan fraksi III memiliki profil yang sama dengan fraksi IV. Setiap fraksi dengan profil yang sama kemudian digabung sehingga diperoleh dua fraksi gabungan yaitu fraksi C1 dan fraksi C2.

Fraksi C1 dan fraksi C2 selanjutnya diuji toksisitasnya terhadap larva *A. salina* untuk mengetahui nilai LC_{50} dari masing-masing fraksi. Data hasil uji toksisitas terhadap larva *A. salina* dapat dilihat pada Lampiran 4 Berdasarkan data uji toksisitas diperoleh nilai LC_{50} untuk fraksi C1 yaitu sebesar 301,50 ppm sedangkan nilai LC_{50} untuk fraksi C2 sebesar 336,67 ppm. Fraksi dengan nilai LC_{50} terbesar yaitu fraksi C1 selanjutnya diidentifikasi senyawa kimianya dengan pereaksi warna untuk mengetahui golongan senyawanya dan dengan GCMS (*Gas Chromatography*

Mass Spectrometer) untuk mengetahui tingkat pemisahan senyawa dan jenis senyawa kimianya.

Identifikasi Senyawa Kimia Fraksi Aktif (C1)

Uji golongan senyawa

Uji kualitatif golongan senyawa kimia dimaksudkan untuk mengetahui komponen kimia dari fraksi aktif yaitu fraksi C1 dari ekstrak metanol kloroform kulit batang *R. mucronata* yang bersifat toksik terhadap larva *A. salina*. Adapun hasil uji golongan senyawa kimia fraksi C1 kulit batang *R. mucronata* dapat dilihat pada Tabel 4 berikut:

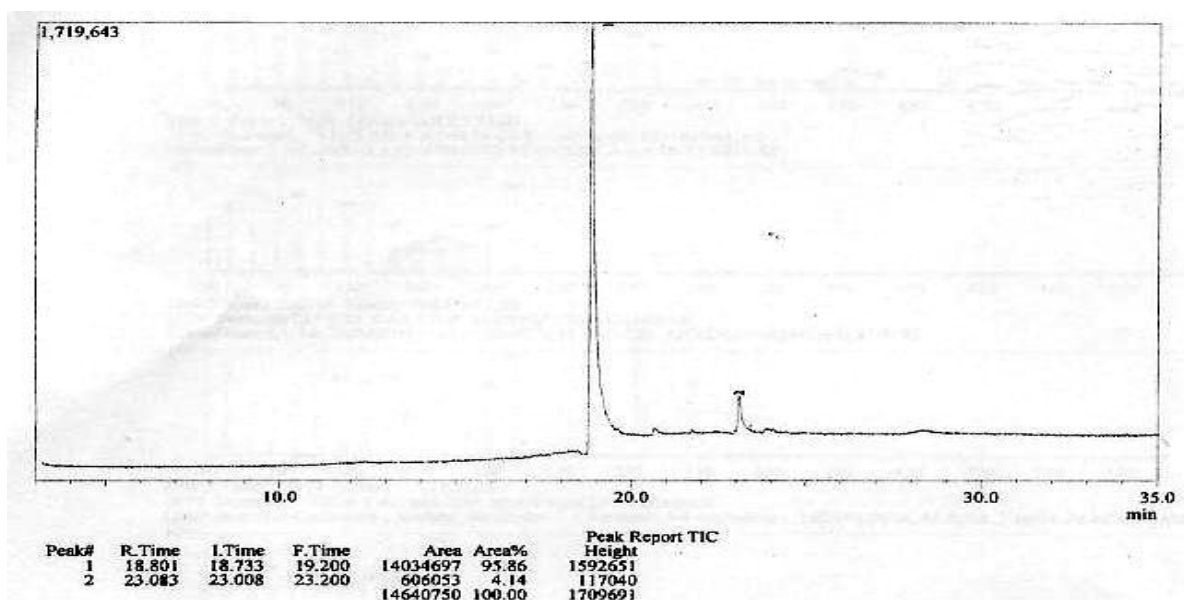
Tabel 4. Hasil Uji kualitatif golongan senyawa ekstrak etanol *R. Mucronata*

Sampel	Flavonoid	Terpenoid	Alkaloid
Fraksi C1	-- (coklat)	++ (biru-ungu)	-- (coklat)

Hasil uji dengan pereaksi warna menunjukkan bahwa fraksi kloroform ekstrak metanol kulit batang *R. mucronata* positif terhadap terpenoid sedangkan uji terhadap adanya senyawa flavonoid dan alkaloid diperoleh hasil negatif (tidak teridentifikasi).

Analisis dengan GC-MS

Hasil analisis fraksi C1 dengan GC-MS menunjukkan bahwa fraksi C1 minimum mengandung 2 senyawa yang ditunjukkan dengan adanya 2 puncak utama pada kromatogram yaitu pada waktu retensi 18,80 menit dan 23,08 menit. Kromatogram fraksi C1 dapat dilihat pada Gambar 1 di bawah ini.



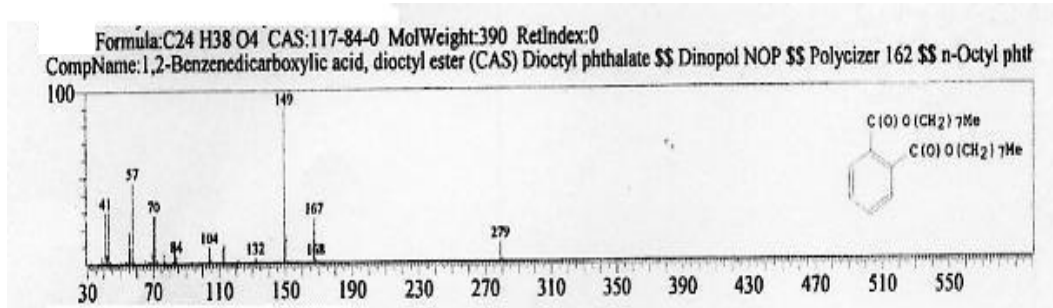
Gambar 1. Kromatogram fraksi C1

Hasil identifikasi senyawa berdasarkan spektrum massa menunjukkan bahwa kedua senyawa tersebut adalah senyawa dari golongan

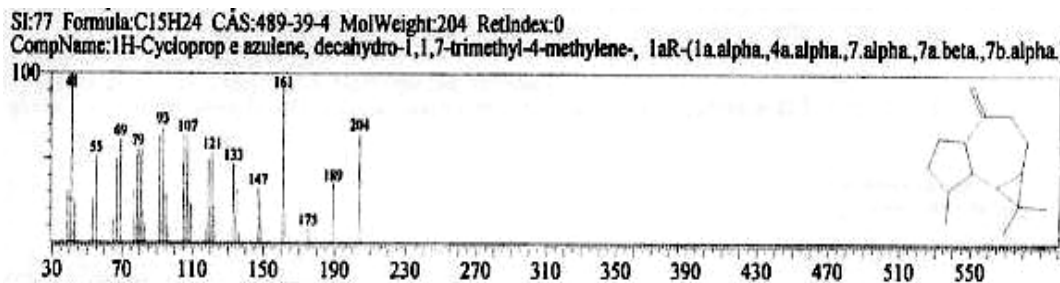
ester aromatik dikarboksilat yaitu dioktiltalat dan senyawa dari golongan terpenoid azulena yaitu dekahidro-1,1,7-trimetil-4-metilena-

siklopropil azulena. Spektrum massa dari kedua senyawa di atas dapat

dilihat pada Gambar 2 dan 3.



Gambar 2. Spektrum senyawa dioktilftalat



Gambar 3. Spektrum senyawa dekahidro-1,1,7-trimetil-4-metilena-siklopropil azulena

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh kesimpulan :

1. Hasil uji toksisitas terhadap larva udang *A. salina* menunjukkan bahwa ekstrak kloroform memiliki nilai LC_{50} tertinggi yaitu 744,31 ppm.
2. Hasil fraksinasi ekstrak kloroform diperoleh fraksi C1 dan fraksi C2 dengan nilai LC_{50} untuk fraksi C1 adalah sebesar 301,50 ppm sedangkan nilai LC_{50} untuk fraksi C2 sebesar 336,67 ppm.
3. Hasil identifikasi senyawa dengan GC-MS menunjukkan bahwa fraksi C1 mengandung 2 senyawa dari golongan ester aromatik dikarboksilat yaitu dioktil ftalat dan senyawa dari golongan terpenoid azulena yaitu dekahidro-1,1,7-

trimetil-4-metilena-siklopropil azulena.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih kami sampaikan kepada Jurusan MIPA Unsoed yang telah memberi dana penelitian melalui dana DIPA MIPA Unsoed.

DAFTAR PUSTAKA

- Dwiatmaka, Y. 2000. *Skrining Tanaman Berkhasiat Antikanker dengan Metode BST*. Santa Darma. Yogyakarta.
- Ghosh, A, S. Misra, AK. Duta, and A.Choudhury. 1985. Pentacyclic triterpenoids and Sterols from Seven Species of Mangrove. *Phytochemistry*. 24(8):1725-1727.
- Harborne JB, 1987, *Metode Fitokimia Penuntun Modern Menganalisis Tumbuhan*, Edisi II, Penerbit ITB. Bandung.
- Lisdawati, V. (2002). *Buah Mahkota Dewa (Phaleria macrocarpa Boerl), Toksisitas, Efek Antioksidan dan Efek Antikanker berdasarkan Uji Penapisan Farmakologi*.
<http://ver.mahkotadewa.com/VFC/Vivi>. htm. diakses tanggal 3 Juni 2007.
- Ma'at, S. 2004. Obat Tradisional Untuk Pelayanan Kesehatan Formal. *Prosiding Seminar Nasional*. Tanggal 5 September 2004. Surabaya. P. 45-49.
- Ningsih, D.R, Warsinah, dan Suwandri. 2006. Fraksinasi Ekstrak Metanol Kulit Batang *Rhizophora mucronata* dan Uji Daya Hamatnya Terhadap Bakteri *Escherechia coli*. *Molekul I(1)* : 30-35.
- Nursal dan N. Pasaribu.2003. *Indeks Nutrisi Larva Instar V. Heliothis armigera Hubner pada Makanan yang Mengandung Ekstrak Kulit Batang Bakau (Rhizopora mucronata) dan Temperatur yang Berbeda*.
<http://library.usu.ac.id/modules.php>
p. Diakses 31 Mei 2007.
- Ranutriwijaya, N. 1994. *Telaah Fitokimia Daun Bakau (Rhizopora mucronata)*. Lamk).
http://ftp.ui.edu/bebas/v12.artikel/ttg_tanaman-obat/depkcs-2/buku10.pdf. Diakses 31 Mei 2007.
- Saputra, K., Ma'at, S., and Soedoko, R., 2000. *Terapi Biologi Untuk Kanker*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Soetarno, S.2000. Potensi dan Manfaat Tumbuhan Mangrove sebagai Sumber Bahan Bioaktif. *Acta Pharmaceutica Indonesia*. 12 (4) : 84-103.
- Warsinah, P. Lestari, Trisnowati, 2005, Isolasi Senyawa Bioaktif pada Kulit Batang *B. gymnorhiza* Sebagai Bahan Antikanker. *Laporan Penelitian Dasar*. Program Sarjana MIPA UNSOED, tidak dipublikasikan

Lampiran 1.**Data uji toksisitas ekstrak kulit batang *R. mucronata* terhadap *A. salina* Leach**

Ekstrak	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata hidup	% mati	log. kons	LC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
Heksana	500	8,00	20,00	2,70	3014,98
	250	8,70	13,30	2,40	
	125	8,70	13,30	2,10	
	62,5	8,70	13,30	1,80	
Kloroform	500	5,00	50,00	2,70	744,32
	250	7,30	26,70	2,40	
	125	7,70	23,70	2,10	
	62,5	8,00	20,00	1,80	
Etil asetat	500	6,00	40,00	2,70	1876,531
	250	7,30	26,70	2,40	
	125	5,70	43,30	2,10	
	62,5	7,70	33,30	1,80	
Metanol	500	4,00	60,00	2,70	1063,406
	250	7,00	30,00	2,40	
	125	8,30	16,70	2,10	
	62,5	7,70	33,30	1,80	

Lampiran 2.**Data uji toksisitas fraksi kloroform (C) kulit batang *R. mucronata* terhadap *A. salina* Leach**

Fraksi	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata hidup	% mati	log. kons	LC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
C1	1000	3,33	66,70	3,00	301,503
	500	4,00	60,00	2,70	
	250	7,67	23,33	2,40	
	125	9,00	10,00	2,10	
	62,5	9,00	10,00	1,80	
C2	1000	0,67	93,30	3,00	336,675
	500	4,00	60,00	2,70	
	250	7,00	30,00	2,40	
	125	8,33	16,70	2,10	
	62,5	8,67	13,30	1,80	