

**UJI TOKSISITAS SENYAWA HASIL ISOLASI DARI EKSTRAK DAUN PURING
(*Codiaeum varigatum* L. BI.) TERHADAP *Artemia salina***

**TOXICITY TEST OF THE RESULT ISOLATION COMPOUND OF THE PURING
(*Codiaeum Varigatum* L. BI.) LEAF EXTRACT TO *Artemia salina***

Risma Jamilatul Inayah and Nurul Hidajati*

Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences
Universitas Negeri Surabaya

Jl. Ketintang, Surabaya (60231), Telp. 031-8298761

*Corresponding author, email : nurulhidajati@unesa.ac.id

Abstrak. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan struktur molekul serta mengetahui tingkat toksisitas senyawa hasil isolasi dari ekstrak daun puring (*Codiaeum varigatum* L. BI.) terhadap larva *Artemia salina*. Penentuan struktur molekul dilakukan dengan metode isolasi dan identifikasi. Isolasi dilakukan dengan metode ekstraksi, pemisahan dilakukan dengan metode KCV dan KKG, serta pemurnian dilakukan dengan metode rekristalisasi. Identifikasi dilakukan dengan spektrofotometri UV – VIS, FTIR, dan GCMS. Uji tingkat toksisitas senyawa hasil isolasi dilakukan dengan metode BSLT. Pada proses ekstraksi dihasilkan ekstrak kental sebanyak 7,096 gram. Selanjutnya, pada proses isolasi daun puring menghasilkan isolat yang berupa kristal berwarna putih sebanyak 0,7219 gram. Berdasarkan hasil identifikasi, isolat yang dihasilkan merupakan dua senyawa yaitu terpenoid dan steroid dengan titik leleh 252 – 253⁰C. Hasil spektrofotometri UV – VIS menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang 210 nm. Sementara hasil spektrofotometri FTIR menunjukkan adanya gugus OH pada bilangan gelombang 3433,41 cm⁻¹. Regang C-H alkil pada bilangan gelombang 2958,90 dan 2868,24 cm⁻¹, adanya serapan lemah yang menunjukkan gugus C = C pada bilangan gelombang 1660,77 dan 1639,55 cm⁻¹. Adanya gugus tekuk C – H pada bilangan gelombang 1062,81 cm⁻¹, adanya gugus C – C pada bilangan gelombang 1022,31 cm⁻¹, adanya gugus metil (CH₃) pada bilangan gelombang 1381,08 cm⁻¹. Berdasarkan hasil spektrofotometri GCMS, menunjukkan bahwa isolat merupakan senyawa Lupeol dengan m/z 426 [M⁺] dan senyawa β – Sitosterol dengan m/z 414 [M⁺]. Tingkat toksisitas senyawa hasil isolasi dari ekstrak daun puring (*Codiaeum varigatum* L. BI.) terhadap *Artemia salina* memiliki tingkat toksisitas sangat toksik dengan nilai LC₅₀ sebesar 66,33 µg/mL.

Kata kunci : Isolasi, uji toksisitas, *Artemia salina*, *Codiaeum varigatum* L. BI.

Abstract. This research aims to determine the molecular structure and to determine the toxicity of the isolated compound from Puring (*Codiaeum varigatum* L. BI.) leaves extract to *Artemia salina* larvae. In this research, determine the molecular structure is done by isolation and identification methods. The isolation was done by extraction method, the separation was done by vacuum liquid chromatography (KCV) and column gravity chromatography (KKG), and purification was done by recrystallization method. Identification was done by UV – VIS, FTIR, and GCMS spectroscopy. While the toxicity level test of the isolated compound was done by BSLT method. In the extraction process resulting viscous extract as much as 7,096 grams. Then, on isolation process of Puring's leaf resulting isolates in the form white crystal as much as 0,7219 grams. Based on the identification results, the isolates produced were estimated mixed compounds terpenoid and steroids with melting point of 252 - 253⁰C and is a white crystalline. UV - VIS spectrophotometry results show maximum absorption at 210 nm wavelength. While the result of IR spectrophotometry showed the presence of OH group at wave number 3433,41 cm⁻¹. Strain C-H alkyl on wave number 2958,90 and 2868,24 cm⁻¹, weak absorption showed C = C group at wave number 1660,77 and 1639,55 cm⁻¹. The presence of a C - H buckling group in the wave number 1062.81 cm⁻¹, the presence of C - C groups in the wave number 1022.31 cm⁻¹, the presence of methyl group (CH₃) at wave number 1381,08 cm⁻¹. Based on MS spectrophotometry results, the isolates were Lupeol compounds with m / z 426 [M⁺] and β-Sitosterol compounds with m / z 414 [M⁺]. The level of toxicity of the isolated compound of Lupeol and β - Sitosterol from puring leaf extract (*Codiaeum varigatum* L. BI.) to *Artemia salina* by BSLT method has very toxic with LC₅₀ value of 66,33 µg / mL.

Keywords : Isolation, toxicity test, *Artemia salina*, *Codiaeum varigatum* (L.) BI.

PENDAHULUAN

Kanker merupakan salah satu penyakit mematikan yang paling utama di dunia. Penyakit kanker ditandai dengan pertumbuhan sel abnormal yang tidak terkendali. Obat anti kanker disebut juga dengan obat sitotoksik yang bertujuan untuk merusak secara selektif sel kanker atau tumor yang berbahaya dan mengganggu sel normal [1]. Pengobatan penyakit kanker dapat dilakukan secara medis, dimana pengobatan tersebut memerlukan biaya yang sangat tinggi, maupun alternatif atau herbal. Pengobatan secara medis yang sering dilakukan adalah pembedahan, radiasi dan kemoterapi. Pengobatan dengan cara ini menyebabkan banyak efek samping seperti mual, muntah, rambut rontok, iritasi, dan lain – lain.

Untuk mengatasi masalah ini, para peneliti sedang gencar – gencarnya melakukan penelitian untuk menemukan alternatif obat kemoterapi yang tepat untuk pengobatan kanker yang berasal dari tanaman herbal. Salah satu tanaman yang berpotensi memiliki sifat sitotoksik adalah tanaman puring (*Codiaeum variegatum*).

Daun puring secara aktivitas biologi dapat dimanfaatkan sebagai antitumor, sitotoksik, aktivasi virus, antifungi, dan antimikroba [2]. Daun puring memiliki aktivitas sitotoksik pada penderita leukemia, kanker payudara dan kanker prostat [3]. Berdasarkan hasil uji fitokimia daun puring yang telah dilakukan oleh Sangha R Bijekar dan M.C Gayatri (2014) menunjukkan bahwa di dalam daun puring terdapat kandungan fenolik sebesar 35,43 – 39,76%, flavonoid (33,01 – 37,63 %), terpenoid (27,56 – 30,03 %), saponin (11,36 – 13,76 %), tannin (10,5 – 15,32 %), dan alkaloid (5 %).

Senyawa triterpenoid memiliki aktivitas sitotoksik, tidak hanya menghambat kehidupan sel neoplastik tetapi juga menginduksi apoptosis sel kanker [5]. Senyawa fenolik dapat berperan sebagai kemopreventif atau memacu menghambat siklus sel atau apoptosis [6]. Penelitian relevan tentang uji aktivitas sitotoksik sebagai antikanker telah dilakukan dengan mengisolasi senyawa terpenoid ekstrak metanol daun tumbuhan *Croton regelianus* sebagai antikanker [7].

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini : etanol 96%, n- heksan, etil asetat, kloroform, kertas saring, plat KLT, fasa diam untuk kromatografi

cair vakum (KCV) menggunakan silika gel Merck G-60 F-254, pelat KLT kieselgel G 60 F-254, fasa diam untuk kromatografi kolom gravitasi (KKG) menggunakan silika gel Merck 60, eluen – eluen yang sesuai, dan larva *Artemia salina*.

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat ekstraksi dengan metode maserasi, alat penyaring Buchner, *rotatory vacuum evaporator*, seperangkat alat kromatografi cair vakum (KCV), *differential scanning calorimetry* (DSC), spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu Pharma Spec. UV-1700), spektrofotometer IR (Perkin Elmer USA 89485), spektrofotometer GCMS (Shimadzu QP-2010S), gelas kimia, gelas ukur, chamber, corong pisah, mikropipet.

Prosedur Penelitian

Tahap Pengumpulan dan Penyiapan Sampel

Sampel daun puring didapatkan dari pekarangan rumah peneliti di Pati, Jawa Tengah sebanyak 10 kg. Kemudian dibersihkan lalu dikeringkan di bawah sinar matahari. Setelah kering sampel daun puring digiling hingga diperoleh serbuk halus untuk diekstraksi.

Tahap Isolasi dan Identifikasi Senyawa

Sebanyak 5 kg serbuk daun puring dimaserasi dengan pelarut etanol 96% selama 1 x 24 jam diulang sebanyak 3 kali. Kemudian ekstrak etanol diuapkan dengan *rotatory vacuum evaporator* pada suhu 50°C hingga menghasilkan ekstrak pekat. Sebelum dipartisi, ekstrak kental yang telah didapatkan, terlebih dahulu dilakukan uji fitokimia. Selanjutnya ekstrak kental etanol dipartisi dengan menggunakan pelarut *n-heksana* di dalam corong pisah dan menghasilkan dua bagian yaitu ekstrak etanol dan ekstrak *n-heksana*. Kemudian ekstrak *n-heksana* dipekatkan menggunakan *rotatory vacuum evaporator*, selanjutnya ekstrak *n-heksana* diuji fitokimia. Selanjutnya, ekstrak kental *n-heksana* yang didapat, kemudian dipisahkan dengan kromatografi cair vakum (KCV) dengan fasa diam silika gel untuk KLT menggunakan eluen yang sesuai. Hasil pemisahan kemudian dimonitor dengan KLT. Jika pemisahan belum sempurna maka dipisahkan lebih lanjut dengan KKG.

Pada pemisahan dan pemurnian komponen kimia dari ekstrak kental dengan KKG, maka perlu diperhatikan dalam pemilihan eluen yang sesuai. Kemudian ekstrak kental n - heksana yang didapatkan, dipisahkan dengan dengan

kromatografi kolom menggunakan silika gel yang sesuai, hingga didapatkan fraksi yang menunjukkan satu noda pada plat KLT. Untuk fraksi yang menghasilkan satu noda pada plat KLT kemudian digabung dan dimurnikan dengan rekristalisasi menggunakan pelarut yang sesuai [8].

Kemurnian isolat diuji secara kromatografi lapis tipis (KLT) dengan eluen yang sesuai. Timbulnya satu noda pada berbagai campuran eluen menunjukkan bahwa fraksi tersebut telah mengandung satu senyawa dan relatif murni secara KLT. Kemudian direkristalisasi, selanjutnya dilanjutkan dengan uji fitokimia pada isolat yang didapatkan. Kemudian isolat yang didapatkan, diuji titik leleh dan diidentifikasi dengan spektrofotometer UV-VIS, IR dan GC-MS.

Uji Toksisitas Senyawa Hasil Isolasi dengan Metode BSLT

Sebanyak 5 mg isolat dilarutkan dalam 1 mL n - heksan. Larutan tersebut merupakan larutan induk dengan konsentrasi 5.000 µg/mL (ppm). Dari larutan induk dipipet dimasukkan ke dalam masing – masing vial yang berbeda sebanyak 10, 25, 50, 75, 100 µl menggunakan mikropipet. Kemudian diangin – anginkan agar pelarut dalam vial menguap. Setelah pelarut menguap, kemudian ditambahkan dengan DMSO sambil diaduk hingga isolat larut. Kemudian dimasukkan ke dalam masing – masing vial 10 ekor *Artemia salina* yang berumur 48 jam dan diisi dengan air laut sampai volumenya 5 mL. Kemudian diinkubasi selama 24 jam. Setelah 24 jam, jumlah *Artemia salina* yang mati dihitung. Tiap konsentrasi dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Dilakukan pengulangan dengan prosedur yang sama untuk blanko tetapi tanpa penambahan isolat. Hasil LC₅₀ dari isolat dihitung dengan analisis probit pada program SPSS.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Identifikasi Senyawa Hasil Isolasi

Serbuk daun puring sebanyak 4 kg diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 8 liter selama 1x24 jam diulang sebanyak 3 kali. Setelah dilakukan proses maserasi, kemudian disaring menggunakan corong Buchner untuk mendapatkan ekstrak etanol dan residunya. Setelah didapatkan ekstrak etanol kemudian dipekatkan menggunakan *rotatory vacuum evaporator* pada suhu 50°C hingga

menghasilkan ekstrak pekat. Ekstrak kental etanol kemudian dipartisi menggunakan pelarut n – heksan di dalam corong pisah. Ekstrak kental n – heksan yang dihasilkan sebanyak 7,096 gram. Ekstrak kental n - heksan diuji fitokimia positif mengandung senyawa terpenoid yang ditandai dengan warna merah kecoklatan pada antar permukaan [9].

Ekstrak kental n – heksan yang didapat kemudian dipisahkan dengan kromatografi cair vakum (KCV) menggunakan eluen n – heksan : etil asetat dan didapatkan 93 fraksi. Kemudian fraksi 32 – 37 digabungkan menghasilkan kristal sebanyak 0,605 gram dan dimonitor kembali secara KLT. Berdasarkan hasil monitor secara KLT, noda yang dihasilkan dari penggabungan fraksi tersebut adalah 3 noda. Oleh karena itu diperlukan pemisahan kembali dengan cara kromatografi kolom gravitasi (KKG).

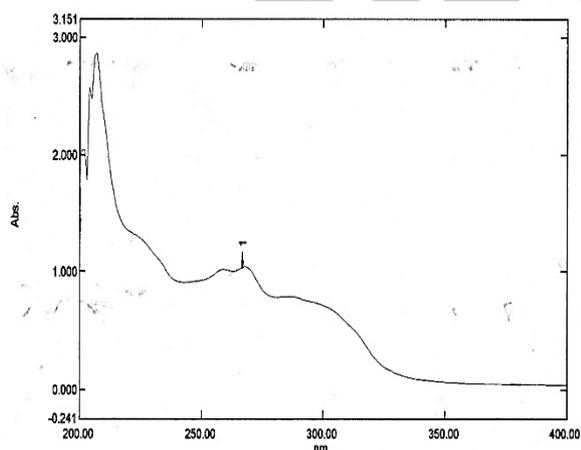
Pemisahan dengan kromatografi kolom gravitasi (KKG) dilakukan dengan cara imregnasi kristal hasil penggabungan dari KCV, kemudian dipisahkan dengan teknik kromatografi kolom gravitasi menggunakan silika gel 60 sebagai fasa diam, dan fase gerak adalah eluen n – heksan : kloroform : etil asetat (4 : 1 : 0,5). Eluat yang dihasilkan kemudian ditampung dalam vial – vial hingga menghasilkan 37 fraksi dan dibiarkan menguap pada suhu ruang hingga terbentuk kristal. Fraksi yang dihasilkan kemudian dimonitor dengan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan eluen n- heksan : kloroform : etil asetat (5 : 0,5 : 1).

Berdasarkan hasil monitoring KLT, fraksi 13 – 23 menghasilkan satu noda dengan nilai R_f 0,058 yang menunjukkan bahwa senyawa yang dihasilkan relatif murni secara KLT. Kristal yang didapatkan dari hasil penggabungan fraksi yang memiliki satu noda yang sama sebesar 1,6179 gram. Kemudian kristal yang didapat dimurnikan dengan cara rekristalisasi menggunakan pelarut etil asetat p.a. Kristal yang didapatkan dari hasil rekristalisasi adalah 0,7219 gram. Uji kemurnian senyawa dilakukan dengan mengukur titik leleh senyawa dan KLT menggunakan tiga eluen. Titik leleh senyawa yang dihasilkan adalah sebesar 252 – 253°C diukur menggunakan Fisher John *melting point apparatus*. Eluen yang digunakan untuk uji kemurnian isolat antara lain n – heksan : kloroform : etil asetat (5 : 0,5 : 1), n – heksan : kloroform : etil asetat (5 : 0,5 : 2), dan n – heksan : etil asetat (5 : 1). Berdasarkan hasil uji KLT dengan sistem

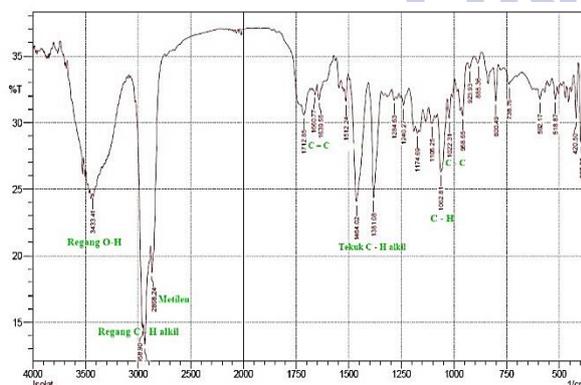
tiga eluen masing – masing menunjukkan satu nada.

Penentuan Struktur Molekul Senyawa Hasil Isolasi

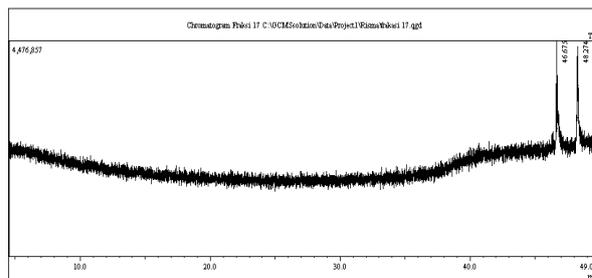
Hasil spektrofotometri UV – VIS pada gambar 1 menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang 210 nm. Sementara hasil spektrofotometri IR pada gambar 2 menunjukkan adanya gugus OH pada bilangan gelombang 3433,41 cm^{-1} . Regang C-H alkil pada bilangan gelombang 2958,90 dan 2868,24 cm^{-1} , adanya serapan lemah yang menunjukkan gugus C = C pada bilangan gelombang 1660,77 dan 1639,55 cm^{-1} . Adanya gugus tekuk C – H pada bilangan gelombang 1062,81 cm^{-1} , adanya gugus C – C pada bilangan gelombang 1022,31 cm^{-1} , adanya gugus metil (CH_3) pada bilangan gelombang 1381,08 cm^{-1} . Berdasarkan hasil spektrofotometri MS, menunjukkan bahwa isolat merupakan senyawa lupeol dengan m/z 427 [M^+] dan senyawa β – sitosterol dengan m/z 414 [M^+].



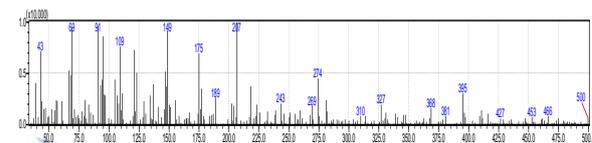
Gambar 1. Spektrum UV – VIS Senyawa Hasil Isolasi



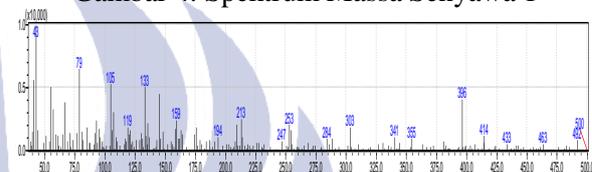
Gambar 2. Spektrum IR Senyawa Hasil Isolasi



Gambar 3. Kromatogram GCMS Senyawa Hasil Isolasi

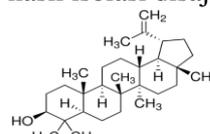


Gambar 4. Spektrum Massa Senyawa 1

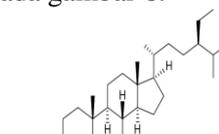


Gambar 5. Spektrum Massa Senyawa 2

Berdasarkan analisis data menggunakan spektrofotometer GCMS yang ditunjukkan pada gambar 3, menunjukkan bahwa isolat menghasilkan kromatogram dua peak (puncak) dengan waktu retensi 46,675 dan 48,274 menit. Dua peak yang dihasilkan menunjukkan bahwa senyawa yang dihasilkan merupakan senyawa campuran. Senyawa 1 yang ditunjukkan pada gambar 4, memiliki ion – ion fragmen pada m/z 426 (M^+), 395, 381, 368, 327, 310, 274, 269, 243, 207, 189, 175, 149, 109, 91, 69, 43. Sementara senyawa 2 yang ditunjukkan pada gambar 5, memiliki ion – ion fraksi pada m/z 414 (M^+), 396, 355, 341, 303, 284, 253, 247, 213, 194, 159, 133, 119, 105, 79, 43. Berdasarkan spektrum massa, senyawa 1 menunjukkan kemiripan dengan spektrum massa senyawa lupeol dengan rumus molekul $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ dan massa molekul relatif 426. Sementara senyawa 2 menunjukkan kemiripan dengan spektrum massa senyawa β – Sitosterol dengan rumus molekul $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ dan massa molekul relatif 414. Struktur molekul senyawa hasil isolasi disajikan pada gambar 6.



Senyawa lupeol



Senyawa β – sitosterol

Gambar 6. Struktur Molekul Senyawa Hasil Isolasi

Uji Toksisitas Senyawa Hasil Isolasi terhadap *Artemia salina*

Pada penelitian ini, metode BSLT digunakan sebagai uji toksisitas dan hewan uji yang digunakan adalah *Artemia salina* yang berumur 48 jam. Hasil uji toksisitas disajikan pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji Toksisitas Senyawa Hasil Isolasi

No	Konsentrasi Isolat (ppm)	Jumlah Kematian <i>Artemia salina</i>			Tingkat Kematian <i>Artemia salina</i> (%)			Rata-rata Kematian <i>Artemia salina</i> (%)
		1	2	3	1	2	3	
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	10	3	2	2	30	20	20	23.33
3	25	3	4	4	30	40	40	36.67
4	50	5	6	4	50	60	40	50.00
5	75	7	6	6	70	60	60	63.33
6	100	8	7	8	80	70	80	76.67

Pada tabel 1 dapat dilihat tingkat kematian larva *Artemia salina* yang tertinggi pada konsentrasi 100 ppm dan yang terendah pada konsentrasi 10 ppm. Setelah dihitung % mortalitas larva *Artemia salina*, maka nilai LC₅₀ dapat ditentukan dengan analisis probit menggunakan program SPSS. Berdasarkan hasil analisis probit menggunakan program SPSS didapatkan nilai LC₅₀ senyawa hasil isolasi sebesar 66,33 µg/mL. Hal tersebut menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi ekstrak daun puring (*Codiaeum variegatum* L. BI.) yang mengandung senyawa lupeol dan β – sitosterol memiliki tingkat toksisitas yang sangat toksik.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil analisis dan pembahasan di atas, dapat disimpulkan bahwa :

1. Senyawa hasil isolasi dari daun puring (*Codiaeum variegatum* L. BI.) merupakan senyawa campuran dari senyawa triterpenoid yaitu Lupeol dengan rumus molekul C₃₀H₅₀O dan massa molekul relatif 426. Serta senyawa steroid yaitu β – Sitosterol dengan rumus molekul C₂₉H₅₀O dan massa molekul relatif 414. Isolat yang didapatkan berupa kristal putih dan memiliki titik leleh 252 – 253°C.

2. Tingkat toksisitas senyawa hasil isolasi yaitu lupeol dan β – sitosterol dari ekstrak daun puring (*Codiaeum variegatum* L. BI.) terhadap *Artemia salina* dengan metode BSLT memiliki tingkat toksisitas sangat toksik dengan nilai LC₅₀ sebesar 66,33 µg/mL.

DAFTAR PUSTAKA

1. Siswandono, dan Bambang. 2000. *Kimia Medisinal* Edisi II. Surabaya: Universitas Airlangga Press.
2. World Health Organization. 2009. *Medicinal Plants in Papua New Guinea*. Western Pacific: World Health Organization Western Pacific Region.
3. Anim, M. T., Larbie, C., Opong, R. A., Tuffour, I., Awuah Owusu, K. B., and Aning, A. 2016. Extracts of *Codiaeum variegatum* (L.) A. Juss is Cytotoxic on Human Leukemic, Breast and Prostate Cancer Cell Lines. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(II), 087-093.
4. Bijekar, Sangha., Gayatri. 2014. Phytochemical Profile of *Codiaeum variegatum* (L.) BI. *International Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Science*, 22 - 31.
5. Bachran, C., Bachran, S., Sutherland, M., Bachran, D., and Fuchs, H. 2008. Saponins in Tumor Therapy. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, hal. 575-584.
6. Chudzik, Malwina., Iona Korzonex Szlacheta., and Wojciech Krol. 2015. Triterpenes as Potentially Cytotoxic Compounds. *Molecules*, 1610 - 1625.
7. Nath, Rumki., Sawati Roy, Biplab De, and M. Dutta Choudhury. 2013. Anticancer and Antioxidant Activity of Croton : A Review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 63 - 70.
8. Imanta, Elasti., dan Nurul Hidajati. 2017. Uji Biolarvasida Nyamuk *Aedes Aegypti* dari Hasil Isolasi Ekstrak Metanol Tanaman Sambiloto (*Andrographis paniculata* NESS). *Unesa Journal of Chemistry*, 6 (1), 36 – 41.
9. Hartanto, Satrio., dan Nurul Hidajati. 2012. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Terpen dari Ekstrak Kulit Batang *Aglaiia odorata* Lour (*Meliaceae*). *Unesa Journal of Chemistry*, 1 (1).