

UJI TOKSISITAS EKSTRAK KULIT BATANG PULAI BASUNG (*ALSTONIA SPATULATA* BL) DENGAN METODE BRINE SHRIMP LETHALITY TEST

Haiyul Fadhli, Hilwan Yuda Teruna* dan Christine Jose

Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau
Kampus Binawidya KM 12,5 Simpang Baru Pekanbaru, 28293, Indonesia
E-mail: hyt@unri.ac.id

Abstract

An investigation on the toxicity of pulai basung (*Alstonia spatulata* Bl) extract has been done using brine shrimp lethality test (BSLT) method. The extract was obtained by macerating the stem barks of *A. spatulata* using *n*-hexane and methanol respectively. The methanol extract was fractionated based on a method for isolation of alkaloid compounds to afford a crude alkaloid extract. Since a trace of alkaloids was detected in the remaining aqueous solution, this solution was then partitioned with *n*-butanol to give a *n*-butanol extract. An effect of toxicity from those extracts were identified for their death percentage of *Artemia salina* nauplii and counted for their LC₅₀ by probit analysis. The result showed that the crude alkaloid extract was more toxic than other extracts with LC₅₀ 163 ppm.

Keywords : *Alstonia spatulata* Bl, *Artemia salina* Leach, BSLT, LC₅₀

PENDAHULUAN

Sejak lama penyakit kanker menjadi salah satu penyakit yang menakutkan bagi banyak orang. Hal ini disebabkan karena kanker merupakan penyakit penyebab kematian kedua di dunia setelah penyakit jantung dan pembuluh darah (Tjay & Rahardja, 2007). Kanker payudara merupakan penyebab utama kematian pada wanita di berbagai belahan dunia. Kanker payudara banyak diderita kaum wanita di Indonesia setelah kanker leher rahim (Tjindarbunmi & Mangunkusumo, 2002).

Metode terapi yang lazim dilakukan selama ini untuk mengatasi kanker adalah pembedahan, radiasi dan kemoterapi (Nafrinaldi & Gan, 1995). Pembedahan umumnya tidak efektif lagi untuk sel yang telah mengalami metastasis, penyinaran seringkali tidak efektif dan tidak aman untuk sel-sel yang normal. Sedangkan penggunaan kemoterapi belum memberikan hasil yang optimal karena obat tersebut bekerja tidak spesifik sehingga perlu dikembangkan upaya penemuan obat baru dari alam (Pamilih, 2009; Tjay & Rahardja, 2007).

Obat kanker umumnya merupakan obat hasil sintesis dengan harga relatif mahal dan memiliki efek samping. Sehingga kecenderungan masyarakat untuk kembali ke alam

(*back to nature*) semakin tinggi dengan lebih memilih menggunakan obat-obatan tradisional.

Salah satu tumbuhan yang mengandung senyawa kimia aktif adalah pulai basung. Pulai basung merupakan spesies dari Apocynaceae dengan nama latin *Alstonia spatulata* Bl. Penelitian pada tanaman dengan tingkatan taksonomi yang sama, yaitu pada famili Apocynaceae seperti *Catharanthus roseus* dan *Camptotheca acuminata* (Guirimand et al., 2010) dan genus *Alstonia* (*A. yunnanensis* dan *A. scholaris*) menunjukkan potensi kandungan zat sitotoksik (Jagetia et al., 2005; Jossang et al., 1998).

Penelitian tumbuhan *A. spatulata* ini pernah dilakukan di Universitas Riau (**Gambar 1**). Bagian tumbuhan yang diteliti tersebut adalah daun, kulit batang dan kulit akar. Hasil penelitian menyatakan bahwa daun, kulit batang dan kulit akar tumbuhan *A. spatulata* positif mengandung senyawa alkaloid (Rahmi, 1998; Teruna et al., 2011), pada kulit akar tumbuhan *A. spatulata* ditemukan alkaloid echitamine (Teruna et al., 2011), sedangkan pada daun tumbuhan *A. spatulata* ditemukan alkaloid vincamine (Teruna & Zamri, 2001). Senyawa vincamine ini telah pernah dilaporkan yang diisolasi dari tumbuhan genus *Vinca*, namun belum pernah dilaporkan dari genus *Alstonia*.



Gambar 1. Tumbuhan *Alstonia spatulata* Bl

Di Indonesia pemanfaatan tumbuhan *A. spatulata* hanya sebatas pemanfaatan langsung seperti bahan mebel, bahan bakar, dan akhir-akhir ini merupakan salah satu bahan industri kayu lapis yang memiliki nilai ekonomi yang cukup tinggi (Sutomo & Mukaromah, 2006). Sementara disisi lain komponen bioaktif dan potensi antikanker yang terkandung dalam tumbuhan *A. spatulata* itu sendiri belum diketahui secara pasti. Melalui penelitian ini diharapkan dapat mengetahui kandungan dan potensi antikanker dari tumbuhan *A. spatulata* sehingga tumbuhan *A. spatulata* ini bermanfaat dalam bidang pengobatan sehingga dapat dikembangkan untuk kepentingan masyarakat banyak.

BAHAN DAN METODA

Tumbuhan *Alstonia spatulata* Bl diambil dari daerah Pekanbaru, Provinsi Riau. Kulit batang tumbuhan yang telah dibersihkan dari kotoran yang melekat dikeringkan tanpa sinar matahari langsung, hingga berat konstan. Setelah itu dihaluskan hingga diperoleh serbuk halus dan kemudian siap untuk diekstraksi.

a. Ekstraksi

Sampel kulit batang dari tumbuhan *A. spatulata* yang telah dihaluskan direndam dengan pelarut *n*-heksana selama 24 jam, kemudian sampel diultrasonikasi selama 30 menit. Langkah ini dilakukan sampai 5 kali. Kemudian maserat diuapkan dengan alat *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental *n*-heksana dan ditimbang beratnya.

Residu dari maserasi *n*-heksana yang telah bebas lemak direndam dengan metanol selama 24 jam, kemudian diultrasonikasi selama 30 menit. Perendaman dengan metanol dilakukan berulang hingga maserat terakhir memberikan hasil negatif terhadap reagen uji alkaloid. Kemudian maserat diuapkan dengan alat *rotary evaporator* hingga

diperoleh ekstrak kental metanol dan ditimbang beratnya.

Isolasi alkaloid dilakukan dengan metoda ekstraksi asam-basa (Cordell, 1981). Ekstrak metanol yang diperoleh diasamkan dengan asam tartarat 2% sampai pH 3-4, selanjutnya lapisan asam dibasakan dengan larutan amonia sampai pH 9-10, partisi dengan diklorometana. Kemudian lapisan air partisi dengan butanol untuk menarik alkaloid kuarterner sampai lapisan air tersebut negatif terhadap pereaksi Dragendorff. Masing-masing lapisan diklorometana dan butanol yang mengandung alkaloid dikeringkan dengan natrium sulfat anhidrat kemudian dipisahkan, lapisan diklorometana dan butanol masing-masing diuapkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak diklorometana (alkaloid kasar) dan ekstrak butanol (alkaloid kuarterner).

b. Uji Toksisitas

Uji toksisitas dilakukan berdasarkan metoda BSLT (Carballo et al., 2002). Timbang ekstrak total *n*-heksana, metanol, diklorometana dan butanol seperlunya untuk memperoleh ekstrak uji dengan konsentrasi 1.000 µg/ml, 100 µg/ml dan 10 µg/ml. Masing-masing ekstrak di dalam vial uji dibiarkan menguap kemudian dilarutkan kembali dengan 50 µl DMSO, selanjutnya air laut ditambahkan hampir mencapai batas kalibrasi.

Larva udang dimasukkan sebanyak 10 ekor kedalam masing-masing vial yang telah berisi air laut. Air laut ditambahkan lagi beberapa tetes sampai batas kalibrasi, kemudian kematian larva udang diamati setelah 24 jam. Data yang diperoleh dihitung LC₅₀ dengan metoda probit dengan membuat kurva hubungan antara persen penghambatan dengan dosis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi kulit batang *Alstonia spatulata* Bl.

Sebanyak 1,5 kg serbuk kering kulit batang *A. spatulata* dimaserasi dengan *n*-heksana sebanyak 2 kali pengulangan masing-masing selama 24 jam. Hal ini dilakukan untuk membebaskan lemak dan fraksi non-polar yang terdapat pada serbuk sampel. Sebelum maserat disaring terlebih dahulu dilakukan ultrasonikasi yang bertujuan untuk menambah kelarutan senyawa dalam pelarut yang digunakan. Maserat yang sudah disaring dipisahkan menggunakan *rotary evaporator*, sehingga diperoleh ekstrak total *n*-heksana berwarna kuning sebanyak 41,46 gram.

Serbuk sisa perendaman dengan *n*-heksana dikeringkan dan kemudian dilakukan perendaman kembali dengan pelarut metanol sebanyak 3 kali pengulangan masing-masing selama 24 jam. Kemudian dilakukan ultrasonikasi dan *rotary evaporator*, diperoleh ekstrak kental metanol sebanyak 71,09 gram yang berwarna coklat kehitaman.

Sebanyak 50 gram ekstrak metanol diasamkan dengan asam tartarat 2%, selanjutnya lapisan asam dibasakan dengan larutan amonia. Larutan air dipartisi menggunakan diklorometan diperoleh fraksi diklorometan, maka diperoleh alkaloid kasar basa kuat. Sisa larutan air yang telah difraksi diklorometan kemudian dipartisi kembali dengan butanol untuk menarik alkaloid kuarterner. Selanjutnya tiap-tiap fraksi ditambahkan natrium sulfat anhidrat untuk mengikat air yang terbawa dan dilakukan *rotary evaporator* menghasilkan ekstrak kental diklorometan yang berwarna coklat kehitaman sebanyak 1,822 gram dan ekstrak butanol sebanyak 1,523 gram.

Hasil uji toksisitas

Uji pendahuluan aktivitas sitotoksik dengan metoda *Brine Shrimps Lethality Test* (BSLT) terhadap ekstrak total *n*-heksan, metanol, diklorometan dan butanol dapat dilihat pada Tabel 1.

Pembahasan

Perendaman serbuk sampel dengan menggunakan *n*-heksana dilakukan untuk menarik senyawa yang non polar seperti minyak atau lemak yang terdapat dalam sampel (defatting). Untuk menarik fraksi alkaloid dipergunakan pelarut metanol sehingga diperoleh ekstrak metanol. Ekstrak metanol diasamkan dengan asam tartarat 2%, hal ini dilakukan untuk membentuk garam

alkaloid yang larut dalam air. Untuk membebaskan alkaloidnya dilakukan dengan cara penambahan amonia. Selanjutnya alkaloidnya dipartisi dengan menggunakan diklorometan. Fraksi diklorometan yang masih mengandung air dihilangkan airnya dengan menggunakan natrium sulfat anhidrat, kemudian disaring. Fraksi diklorometan diuapkan pelarutnya sehingga diperoleh ekstrak kental diklorometan sebanyak 1,822 gram.

Uji toksisitas yang dilakukan dengan metoda *Brine Shrimps Lethality Test* (BSLT) menggunakan larva *Artemia salina* Leach terhadap ekstrak total *n*-heksana, metanol, diklorometana dan butanol menghasilkan suatu data (Tabel 1) yang kemudian diolah dengan metoda probit untuk menentukan nilai LC_{50} . Hasil analisis data diperoleh nilai LC_{50} untuk ekstrak total *n*-heksan >1000 ppm, ekstrak total metanol >1000 ppm, fraksi diklorometana 136 ppm dan fraksi butanol >1000 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi diklorometana mempunyai sifat sangat toksik dan ekstrak total *n*-heksana, ekstrak total metanol dan fraksi butanol tidak bersifat toksik terhadap uji kematian larva udang, karena suatu sampel dianggap toksik terhadap uji kematian larva udang jika konsentrasi maksimum 1000 ppm dengan $LC_{50} \leq 500$ ppm (Meyer et al., 1982). Uji toksisitas fraksi diklorometana mempunyai nilai LC_{50} yaitu 136 ppm, hal ini menunjukkan bahwa fraksi diklorometana bersifat toksik karena suatu senyawa dikatakan aktif jika LC_{50} sebesar ≤ 250 ppm dan maksimal konsentrasi 500 ppm (Meyer et al., 1982). Hasil uji toksisitas pada fraksi diklorometana menunjukkan bahwa senyawa yang diisolasi dari ekstrak metanol kulit batang *A. Spatulata* sudah terpisah antara senyawa yang aktif dan senyawa yang tidak aktif. Senyawa yang bersifat toksik dapat dilanjutkan uji aktivitas anti kanker.

Tabel 1. Nilai LC_{50} uji BSLT ekstrak total *n*-heksana, metanol, diklorometan, dan butanol.

Fraksi	Konsentrasi (ppm)	Mortalitas (%)	LC_{50} (ppm)	Keterangan
Ekstrak <i>n</i> -heksana	1000	10	>1000 ppm	Tidak toksik
	100	0		
	10	0		
Ekstrak metanol	1000	37	>1000 ppm	Tidak toksik
	100	27		
	10	20		
Ekstrak diklorometana	1000	74	136 ppm	Toksik
	100	60		
	10	10		
Ekstrak butanol	1000	44	>1000ppm	Tidak toksik
	100	34		
	10	17		
Kontrol	0	0	0	-

KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini yaitu ekstrak diklorometana kulit batang Pulai Basung (*Alstonia spatulata* Bl) bersifat toksik terhadap larva udang *A. Salina*

Leach. dengan nilai LC₅₀ sebesar 163 ppm. Ekstrak ini berpotensi untuk diteruskan isolasinya untuk mendapatkan senyawa yang bersifat anti tumor atau anti kanker.

DAFTAR PUSTAKA

- Carballo, J., Hernández-Inda, Z., Pérez, P., & García-Grávalos, M. (2002). A Comparison Between Two Brine Shrimp Assays to Detect In Vitro Cytotoxicity In Marine Natural Products. *BMC Biotechnology*, 2(1), 17.
- Cordell, G.A. (1981). *Introduction to Alkaloids: A Biogenetic Approach*. New York: Wiley.
- Gabriel, J., & Ebrary, I. (2007). *The Biology of Cancer* (2 ed.). England: John Wiley & Sons.
- Guirimand, G., Courdavault, V., St-Pierre, B., & Burlat, V. (2010). Biosynthesis and Regulation of Alkaloids. In E-C. Pua & M.R. Davey (Eds.), *Plant Developmental Biology–Biotechnological Perspectives* (Vol. 2). Berlin: Springer-Verlag.
- Harborne, J. B. (1998). *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*.
- Jagetia, G.C., Baliga, M.S., Venkatesh, P., Ulloor, J.N., Mantena, S.K., Genebriera, J., & Mathuram, V. (2005). Evaluation of the Cytotoxic Effect of the Monoterpene Indole Alkaloid Echitamine In-vitro and In Tumour-bearing Mice. *J. Pharm Pharmacol*, 9, 1213-1219.
- Jossang, A., Fodor, P., & Bodo, B. (1998). A New Structural Class of Bisindole Alkaloids from the Seeds of *Catharanthus roseus*: Vingramine and Methylvingramine. *The Journal of Organic Chemistry*, 63(21), 7162-7167.
- Katzung, B. G. (1995). *Farmakologi Dasar dan Klinik* (Agoes, Trans. VI ed.). Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Meyer, BN, Ferrigni, NR, Putnam, JE, Jacobsen, LB, Nichols, D.E., & McLaughlin, JL. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta medica*, 45(5), 31.
- Nafrinaldi, & Gan, S. (1995). Antikanker dan Imunosupresan. In G. G. Sulistia (Ed.), *Farmakologi dan Terapi* (4 ed.). Jakarta: Bagian Farmakologi FKUI.
- Pamilih, H. (2009). *Uji Sitotoksik Ekstrak Etil Asetat Herba Bandotan (Ageratum conyzoides L.) Terhadap Sel Kanker Payudara (T47D) dan Profil Kromatografi Lapis Tipis*. (S1), Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.
- Rahmi, F. (1998). *Isolasi Senyawa Alkaloid dari daun Tumbuhan Alstonia spatulata (Apocynaceae)*. (S1), Universitas Riau, Pekanbaru.
- Supardi. (1999). *Isolasi Alkaloid dari Kulit Akar Tumbuhan Alstonia spatulata (Apocynaceae)*. (S1), Universitas Riau, Pekanbaru.
- Sutomo, & Mukaromah, L. (2006). Marga *Alstonia* (Apocynaceae) dan Potensinya. *UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya "Eka Karya" Bali-LIPI*.
- Teruna, H. Y., Latip, J., Kamal, R., & Fadhli, H. (2011). *A Quaternary Alkaloid from Alstonia spatulata Bl (Apocynaceae)*. Seminar Nasional Himpunan Kimia Indonesia. Universitas Riau, Pekanbaru.

- Teruna, H. Y., & Zamri, A. (2001). *Vincamine dari Alstonia spatulata*. Pekanbaru: Seminar Hasil Penelitian Dosen Universitas Riau.
- Tjay, T.H., & Rahardja, K. (2007). *Obat-Obat Penting: Khasiat, Penggunaan dan Efek-Efek Sampingnya*. Jakarta: Elex Media Komputindo.
- Tjindarbumi, D., & Mangunkusumo, R. (2002). Cancer in Indonesia, Present and Future. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 32(suppl 1), S17-S21.

