

Uji toksisitas fraksi daun ambre (*Geranium radula*) terhadap *Artemia salina* dan profil kandungan kimia fraksi teraktif

Toxicity test of ambre leaf fractionation (*Geranium radula*) against *Artemia salina* and chemistry compound profile of the most active fraction

NORMA AMBARWATI, RITA RAKHMAWATI, DINAR SARI CAHYANINGRUM WAHYUNI

Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Sebelas Maret, Jl. Ir. Sutami 36a Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 19 Maret 2014. Revisi disetujui: 18 Desember 2014.

Abstract. Ambarwati, Rakhmawati R, Wahyuni DSC. 2015. Toxicity test of ambre leaf fractionation (*Geranium radula*) against *Artemia salina* and chemistry compound profile of the most active fraction. *Biofarmasi* 13: 15-24. According to Brine Shrimp Lethality Test (BST), ambre (*Geranium radula* Cavan.) is a plant has toxic effect, that's why it may use as anticancer agent. A previous research used screening toxicity of some plants in Tawangmangu, Surakarta that used BST method showed that chloroform extract from Ambre leaves the biggest toxicity activities. According to that research, we need to do further research about toxicity test, and ambre leaves bioactive component to find scientific result. Toxicity test with BST method has been done by including ten larva *Artemia salina* Leach into flacon contains test sample. Death percentage of *A. salina* larva was counted 24 hours after giving of test sample rate series, then made equation of linear regression to determine values of LC50-24 hours. The result of toxicity test showed that fraction IV ambre leaves are fraction that has the highest toxic because it has the biggest percentage of death for all of the concentration series that has been experimented with values of LC50-24 hours = 776.46 µg/mL. Fraction IV as the most active fraction is identified its chemical compound with Thin Layer Chromatography (TLC). The detection result showed that fraction IV has terpenoid compound by Rf = 0.16; 0.44; 0.85 and phenolic compound by Rf = 0.44; 0.58.

Keywords: Anticancer, BST, *Geranium radula*, toxicity

PENDAHULUAN

Kanker menempati peringkat tertinggi sebagai penyebab kematian di negara berkembang. Usaha penyembuhan dengan obat kanker sintetik umumnya masih relatif mahal dan memiliki efek samping yang besar. Hal tersebut mendorong dilakukannya pencarian sumber obat baru yang berasal dari alam sebagai salah satu kandidat yang berkhasiat antikanker. Indonesia memiliki peluang yang potensial dalam pencarian sumber obat baru dari bahan alam tersebut. Indrayani et al. (2006) menyatakan bahwa Indonesia sebagai salah satu negara tropis yang kaya sumber daya hayati, memiliki sekitar 30.000 spesies tumbuhan, dan kurang lebih 7000 spesies di antaranya yang baru diketahui sebagai tanaman berkhasiat obat. Diperkirakan sekitar 76% spesies tanaman di Indonesia belum diketahui manfaat dan khasiatnya, sehingga berpeluang untuk diteliti lebih lanjut.

Keberadaan senyawa aktif ataupun ekstrak aktif dari bahan alam dapat diperoleh menggunakan suatu uji aktivitas (*bioassay*) dimana satu modelnya adalah metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) (Meyer et al. 1982). Sejumlah data eksperimental membuktikan bahwa skrining toksisitas tanaman menggunakan metode BST menghasilkan senyawa-senyawa hasil isolasi yang memberikan efek sitotoksik terhadap sel kanker. Wahyuningsih et al. (2008), melakukan eksplorasi terhadap 140 macam ekstrak tanaman hutan Kalimantan Tengah

yang diuji dengan metode BST, diperoleh 17 ekstrak aktif dengan kematian larva *Artemia salina* 100% pada konsentrasi 500 µg/mL. Penurunan konsentrasi ekstrak sampai 100 µg/mL, diperoleh 10 ekstrak yang potensial dikembangkan sebagai sumber senyawa bioaktif. Senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak kloroform *Fibraurea chloroleuca* dapat diisolasi menggunakan BST dengan *Lethal Concentration* 50 (LC50) sebesar 4,5 µg/mL

Carballo et al. (2002) melaporkan bahwa terdapat korelasi yang baik antara metode BST dengan uji sitotoksik menggunakan kultur sel kanker. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh Wahyuni dan Rakhmawati (2008), skrining toksisitas beberapa tanaman di kawasan Tawangmangu Surakarta menggunakan metode BST menunjukkan bahwa ekstrak kloroform dari daun ambre (*Geranium radula* Cavan.) memberikan aktivitas toksisitas yang paling besar. Hal ini ditunjukkan dengan nilai persentase kematian tertinggi berdasarkan hasil uji BST pada ekstrak kloroform jika dibandingkan dengan keempat tanaman yang lain (Wahyuni dan Rakhmawati 2008). Berdasarkan hal tersebut, tanaman ambre berpotensi sebagai sumber obat baru kandidat antikanker, namun agar dapat dipertanggungjawabkan, diperlukan penelitian ilmiah lebih lanjut tentang komponen bioaktif dari tanaman ambre, terutama bagian daunnya.

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui efek toksik dari fraksinasi daun ambre (*Geranium radula* Cavan.) terhadap *Artemia salina* Leach, dan mengetahui kandungan kimia fraksi teraktif daun ambre.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni-September 2009 di Sub Lab. Biologi Laboratorium Pusat Universitas Sebelas Maret Surakarta dan Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

Alat dan bahan penelitian

Pelarut penyari yang digunakan untuk proses pemisahan komponen bioaktif dalam penelitian ini adalah kloroform. Semua pelarut yang disebutkan selanjutnya berderajat pro analisis dari E. Merck, kecuali disebutkan lain. Air yang digunakan adalah aquades.

Daun ambre (*Geranium radula* Cavan.) diperoleh dari B2P2TO2T (Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional) Tawangmangu pada bulan Juni 2009.

Fase diam yang digunakan yaitu plat silika gel 60 GF254 (E. Merck) dan fase gerak yang digunakan yaitu etil asetat dan kloroform berderajat pro analisis dengan perbandingan tertentu. Pereaksi semprot Serium (IV) sulfat dan beberapa pereaksi semprot spesifik.

Telur *Artemia salina* Leach, air laut dengan kadar garam 5%, suspensi ragi (Fermipan®) dengan konsentrasi 3 mg/10 mL air laut dan aquades.

Fase diam yang digunakan silika gel 60 GF254 (E. Merck) dan fase gerak *wash-benzena*, etil asetat, kloroform dan metanol berderajat teknis.

Pereaksi semprot serium (IV) sulfat (pemanasan 110°C, 10-15 menit): Serium sulfat anhidrat 0,5 g, asam sulfat pekat 1,4 mL, dan aquades 25 mL. Reagent dragendorf: bismuth subnitrat (Bi (NO₃)₃) 0,17 g, aquades 12 mL, asam asetat glasial 2 mL, potasium ioda 1,6 g. FeCl₃: besi (III) klorida 1 g, asam sulfat 20 mL. Vanilin asam sulfat: vanillin 1 g, asam sulfat 25 mL. Lieberman-burchard: 5 mL asam asetat anhidrat, 5 mL asam sulfat pekat dan 50 mL etanol absolut. Anisaldehyd 20 mL, uap amonia dan uap iodium.

Rotary evaporator (Heidolp vv 2000, Germany), Oven (Memert, Germany), lampu UV, *syringe*, gelas beker, pipa kapiler, bejana pengembang dan alat-alat gelas lainnya.

Mikropipet 10-1000 µL, mikropipet 20-250 µL, flakon, gelas ukur 50 mL, vortex, lampu 5 watt, neraca analitik, spatula, pipet tetes, wadah penetasan telur dengan 2 tipe ruang (terang dan gelap), kipas angin, dan aerator.

Bejana pengembang, pipa kapiler, gelas arloji, oven, alat penyemprot bercak dan lampu UV.

Alat yang digunakan untuk proses fraksinasi hasil partisi *wash-benzena* adalah: gelas beker, flakon, erlenmeyer, gelas ukur, pipet tetes, pipet volume, dragball, corong Buchner, *sinterglass* (kolom kromatografi), statif, kipas angin dan alat-alat gelas lainnya.

Cara kerja

Persiapan sampel

Sampel yang digunakan adalah daun ambre. Determinasi serta identifikasi dilakukan di B2P2TO2T (Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional) Tawangmangu.

Pemisahan komponen bioaktif

Pada penelitian ini untuk memisahkan komponen bioaktif digunakan ekstraksi dan partisi. Ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan penyari kloroform.

Ekstraksi

Serbuk daun ambre dimaserasi menggunakan kloroform selama 24 jam disertai pengadukan dan maserasi dilakukan hingga 3 kali. Setelah 24 jam, rendaman disaring dengan kertas saring, ampasnya dipisahkan dan maserat I yang diperoleh diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dan disimpan di eksikator.

Ampas dimaserasi kembali dengan kloroform seperti cara diatas sehingga diperoleh maserat II dan III yang telah diuapkan menggunakan *rotary evaporator* digabungkan dengan maserat I sehingga diperoleh ekstrak kloroform ambre.

Partisi dan fraksinasi

Ekstrak kloroform yang didapatkan setelah dimonitor KLT kemudian dipartisi dengan pelarut *wash-benzena* sehingga dihasilkan dua bagian, yaitu bagian larut *wash-benzena* dan bagian tidak larut *wash-benzena*. Kedua bagian tersebut diuapkan. Kedua bagian tersebut dimonitor hasil pemisahannya dengan KLT dan dilakukan uji BST. Bagian yang lebih aktif berdasarkan uji BST difraksinasi sehingga dihasilkan 9 fraksi. Sembilan fraksi dimonitor hasil pemisahannya dengan KLT dan diuji BST.

Fraksinasi dengan metode kromatografi kolom

Preparasi Sampel: Bagian teraktif hasil partisi dilarutkan dengan kloroform dan dikeringkan dengan bantuan kipas angin.

Persiapan kolom: Silika gel 60 GF254 ditimbang kurang lebih 30 gram dan dimasukkan sedikit demi sedikit ke dalam *sinterglass* (kolom kromatografi) sambil diketuk-ketuk dengan batang pengaduk. Selama pengisian kolom ini, *sinterglass* (kolom kromatografi) diketuk-ketuk dengan batang pengaduk. Hal ini dilakukan untuk mencegah terjadinya *cracking* dalam pengisian kolom. Permukaan kolom dibuat serata mungkin. Fase diam yang telah jadi kemudian dielusi dengan pelarut organik yang kepolarannya paling rendah diantara pelarut-pelarut yang digunakan sebagai fase gerak untuk memperbaiki kekompakan kolom sehingga tidak banyak rongga udara dalam kolom.

Penyiapan fase gerak: Fase gerak yang digunakan pada sistem kromatografi kolom ini menggunakan sistem fase bertingkat menurut kepolarannya. Fase gerak dibuat dengan perbandingan tertentu. Perbandingan antara larutan tersebut tergantung dari tingkat kepolaran yang diinginkan, yaitu dari pelarut yang mempunyai tingkat polaritas rendah (nonpolar) ke pelarut dengan tingkat polaritas lebih tinggi

(polar) berturut-turut *wash-benzena*, kloroform, etil asetat dan metanol sehingga dihasilkan beberapa fraksi.

Elusi: Sampel ditambahkan ke permukaan fase diam yang telah dibuat kemudian ditutup dengan kertas saring. Hal ini bertujuan agar permukaan kolom tidak rusak saat dialiri fase gerak. Selanjutnya dielusi dengan fase gerak yang sudah disiapkan. Elusi dimulai dari pelarut yang kepolarannya paling rendah. Fraksi yang terpisah ditampung dalam wadah penampung.

KLT fraksi-fraksi: Masing-masing fraksi yang diperoleh diuapkan pada cawan porselen sampai kering. Profil kandungan kimia masing-masing fraksi dimonitor dengan kromatografi lapis tipis. Berdasarkan hasil KLT tersebut, fraksi-fraksi dengan profil kromatogram yang hampir sama dijadikan satu fraksi. Fraksi hasil penggabungan selanjutnya diuji dengan metode BST untuk mengetahui fraksi mana yang paling aktif.

Uji toksisitas dengan Metode BST

Suatu senyawa atau ekstrak dikatakan toksik apabila menunjukkan $LC_{50} < 1000$ $\mu\text{g/mL}$ pada uji dengan BST (Meyer et al. 1982). Berdasarkan hal tersebut maka dilakukan pengujian dengan metode BST dengan konsentrasi 250, 500, dan 1000 $\mu\text{g/mL}$ pada masing-masing sampel uji. Uji dilakukan dengan 3 replikasi, masing-masing replikasi menggunakan 5 flakon untuk tiap konsentrasi demikian juga dengan kontrol.

Preparasi Sampel: Semua sampel dibuat larutan stok yaitu dengan cara melarutkan sampel dalam kloroform. Seri konsentrasi sampel uji dibuat dengan pengambilan volume sebanyak 125, 250, dan 500 $\mu\text{g/mL}$ dari larutan stok menggunakan mikropipet dan dimasukkan dalam flakon. Pembuatan kontrol uji dilakukan dengan memasukkan pelarut saja (kloroform) ke dalam flakon. Kontrol diperlukan untuk mengkoreksi kemungkinan timbulnya efek karena pelarut yang belum menguap sempurna dan pengaruh lain selain pelarut terhadap pengujian yang dilakukan. Flakon-flakon yang telah berisi sampel dan kontrol kemudian diangin-anginkan hingga kering dan tidak berbau pelarut lagi.

Penetasan Telur *A. salina*: Telur *A. salina* ditetaskan dalam wadah penetas telur dengan dua bagian ruang bersekat, satu bagian ruang gelap dan yang satu terang. Sekat dibuat berlubang dengan diameter 2 mm. kemudian air laut tersebut dimasukkan ke dalam wadah, serta diaerasi menggunakan aerator. Sejumlah telur *A. salina* dimasukkan ke dalam satu ruang, kemudian ruang ini ditutup. Sisi yang lain dibiarkan terbuka dan diberi lampu untuk menarik *A. salina* yang telah menetas melalui lubang sekat. Hal ini dilakukan karena *A. salina* memiliki sifat fototaksis. Telur *A. salina* akan menetas setelah kira-kira 24 jam menjadi larva. Larva yang berumur 48 jam dapat digunakan untuk uji toksisitas (McLaughlin, 1991).

Pengujian Sampel: Flakon berisi sampel yang sudah diuapkan pelarutnya diisi air laut 1 mL, kemudian divortex kurang lebih selama 1 menit. Sepuluh ekor larva *A. salina* umur 48 jam yang sehat (bergerak aktif) dipilih secara acak, dimasukkan ke dalam flakon yang berisi sampel dengan menggunakan pipet tetes dan ditambahkan air laut sampai 5 mL. Satu tetes suspensi ragi *Saccharomyces*

cerevicease (3 mg/10 mL air laut) ditambahkan ke dalamnya sebagai makanan larva *A. salina*. Flakon-flakon diletakkan di bawah lampu penerangan selama 24 jam dan dihitung jumlah larva *A. salina* yang mati (tidak bergerak aktif). Selanjutnya dihitung persentase larva *A. salina* yang mati setelah 24 jam, dibandingkan dengan kontrol dan hasilnya dianalisis untuk menentukan nilai LC_{50} .

Penentuan golongan senyawa fraksi teraktif

Fraksi teraktif dilarutkan di pelarut yang sesuai untuk dianalisis kandungan senyawa kimianya dengan metode KLT. Sampel ditotolkan pada lempeng KLT menggunakan pipa kapiler dengan jarak 1 cm dari bawah plat. Pengembangan dilakukan dalam bejana pengembang dengan jarak pengembangan 7 cm menggunakan fase gerak yang sesuai. Hasil KLT dideteksi dengan sinar UV254 nm dan UV366 nm dan disemprot dengan serum (IV) sulfat untuk mendeteksi keberadaan senyawa organik secara umum, dan deteksi spesifik Lieberman-burchad, Dragendorf, FeCl_3 , dan Vanilin-asam sulfat. Setelah dilakukan penyemprotan, masing-masing plat dipanaskan selama 10-15 menit pada suhu 110°C dan kemudian dilakukan penghitungan Rf.

Pembuatan pereaksi semprot deteksi golongan senyawa

Pereaksi semprot serum (IV) sulfat (pemanasan 110°C , 10-15 menit): serum sulfat anhidrat 0,5 g dilarutkan dalam asam sulfat pekat 1,4 mL kemudian diencerkan dengan menambahkan aquades 25 mL.

Reagent Dragendorf: bismuth subnitrat ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$) 0,17 g dilarutkan dalam aquades 8 mL dan asam asetat glasial 2 mL, kemudian ditambahkan potasium ioda 1,6 g yang telah dilarutkan dalam aquades 4 mL.

FeCl_3 : besi (III) klorida 1 g dilarutkan dalam asam sulfat 20 mL.

Vanilin-asam sulfat: vanillin 1 g dilarutkan asam sulfat 25 mL.

Lieberman-burchad: 5 mL asam asetat anhidrat yang dicampur secara hati-hati dengan 5 mL asam sulfat pekat kemudian campuran ini ditambahkan secara hati-hati pula ke dalam 50 mL etanol absolut, setiap pencampuran zat dilakukan dengan pendinginan.

Penentuan persentase kematian larva A. salina

Efek toksik daun ambre terhadap *A. salina* dianalisis dengan menghitung persen kematian larva uji setelah 24 jam perlakuan, dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Kematian} = \frac{\text{jumlah larva } A. \text{ salina mati} \times 100\%}{\text{jumlah larva uji}}$$

Analisis data

Data persentase kematian larva *A. salina* digunakan untuk mencari angka probit melalui tabel dan dibuat persamaan regresi linier:

$$y = bx + a$$

Dimana: y = angka probit, dan x = log konsentrasi

Berdasarkan persamaan di atas, kemudian dihitung LC50-24 jam hasil fraksinasi daun ambre dengan memasukkan nilai probit 5 (50% kematian) ke persamaan tersebut sehingga diperoleh konsentrasi yang menyebabkan 50% kematian. Bila ada kematian pada kontrol dapat dikoreksi dengan rumus Abbo's yaitu:

$$\% \text{ Kematian} = \frac{\text{jumlah larva } A. \text{ salina (mati-kontrol)}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

Suatu senyawa atau ekstrak dikatakan toksik apabila menunjukkan LC50 < 1000 µg/mL pada uji dengan BST (Meyer et al. 1982). Penentuan golongan fraksi komponen kandidat antikanker dideteksi dengan kromatografi lapis tipis dengan fase gerak dan fase diam yang sesuai serta pereaksi semprot yang spesifik. Profil kromatografi lapis tipis hasil deteksi semprot spesifik dianalisis secara kualitatif dengan analisis deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Persiapan sampel

Sampel tumbuhan ambre dideterminasi guna menghindari kesalahan bahan utama penelitian. Jika terjadi kesalahan bahan utama akan menyedatkan peneliti yang nantinya akan bekerja dengan sampel yang sama dan menyebabkan kebingungan dalam literatur ilmiah (Cannell, 1998). Determinasi tumbuhan telah dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO-OT) dan diketahui bahwa tumbuhan yang diteliti adalah *Geranium radula* Cavan.

Pemisahan komponen bioaktif

Pemisahan komponen bioaktif daun ambre digunakan metode ekstraksi dan partisi. Serbuk daun ambre diekstraksi menggunakan metode maserasi yang merupakan proses penyarian yang sederhana baik cara pengerjaan maupun peralatan yang digunakan. Maserasi dilakukan dengan cara merendam sampel uji dalam cairan. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif tersebut akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan yang di luar sel, maka larutan yang terpekat didesak ke luar. Peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel (Hargono, 1986). Perendaman dapat meluruhkan susunan sel sehingga zat aktif yang terkandung di dalam sampel akan terlarut dalam pelarut.

Maserasi dilakukan dengan merendam serbuk daun ambre seberat 290 gram dalam pelarut kloroform (6,3 L). Ekstraksi dengan pelarut kloroform (indeks polaritas = 4,1) ini dimaksudkan untuk menarik senyawa-senyawa yang bersifat non polar hingga semi polar yang terkandung dalam daun ambre. Proses maserasi perlu disertai pengadukan agar terjadi interaksi yang merata antara cairan penyari dengan seluruh permukaan masing-masing serbuk. Selain itu menurut Cannell (1998), pengadukan pada proses maserasi ditujukan untuk meningkatkan efisiensi metode

maserasi supaya kejenuhan pelarut terjadi lebih cepat dan maserat yang diperoleh lebih homogen. Pelarut akan dapat mengalir secara berulang-ulang ke dalam serbuk halus sehingga memungkinkan adanya interaksi antara pelarut dengan serbuk. Kejenuhan terjadi apabila tidak ada perbedaan konsentrasi. Perpindahan pelarut atau zat terlarut dari konsentrasi tinggi ke konsentrasi rendah tidak terjadi apabila konsentrasi di dalam dan diluar sel dalam kondisi yang seimbang. Maserasi dengan kloroform dilakukan hingga 3 kali selama 24 jam, dengan asumsi bahwa senyawa yang dikehendaki telah terambil dalam rentang waktu tersebut.

Maserat dipisahkan dengan cara disaring dengan kertas saring. Langkah selanjutnya maserat yang telah disaring diuapkan dengan *rotary evaporator* dan diperoleh ekstrak kloroform sebanyak 11 gram, berwarna hijau tua kehitamam.

Proses pemisahan pada tahap ekstraksi dimonitor profil kandungan senyawa kimianya dengan KLT, kemudian dilakukan deteksi terhadap keberadaan senyawa kimia organik secara umum yang ada di dalamnya menggunakan pereaksi semprot serum (IV) sulfat. Hasilnya terbentuk bercak yang berwarna coklat setelah

pemanasan. Warna coklat yang terbentuk disebabkan karena dalam serum (IV) sulfat terdapat H₂SO₄ 10% yang bersifat reduktor dalam merusak gugus kromofor dari zat aktif simplisia sehingga panjang gelombangnya akan bergeser ke arah yang lebih panjang sehingga noda menjadi tampak oleh mata, bila dipanaskan bercak pada KLT berubah warnanya menjadi coklat. Deteksi UV digunakan untuk mengetahui senyawa yang tidak terlihat dengan sinar tampak.

Hasil KLT menunjukkan bahwa ekstrak kloroform dapat terelusi naik dengan fase gerak kloroform. Hal ini disebabkan ekstrak kloroform merupakan senyawa nonpolar dan memiliki afinitas yang rendah terhadap plat silika gel sehingga kemampuan migrasi pelarut untuk memisahkan senyawa berjalan cepat (Cannell, 1998).

Deteksi hasil KLT menggunakan sinar tampak, UV254, UV366, dan serum (IV) sulfat menunjukkan adanya beberapa bercak yang terlihat pada masing-masing deteksi. Hasil deteksi KLT terdapat 2 bercak yang terlihat dengan sinar tampak, UV254, UV366, dan serum (IV) sulfat, dan beberapa bercak lainnya yang terlihat tidak terlalu jelas.

Deteksi kromatogram dengan sinar UV254 (Gambar 1) menunjukkan terjadinya peredaman yang ditandai dengan adanya beberapa bercak yang berwarna gelap pada latar belakang berfluoresensi hijau yang menunjukkan adanya senyawa. Deteksi dengan sinar UV366 (Gambar 1) memperlihatkan bercak yang berfluoresensi dan berwarna biru muda yang menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki ikatan rangkap terkonjugasi yang panjang sehingga dapat berpendar pada penyinaran UV gelombang panjang.

Partisi dan uji Brine Shrimp Lethality Test (BST)

Ekstrak kloroform dipartisi menggunakan pelarut *wash-benzena* sehingga dihasilkan dua bagian, yaitu bagian terlarut dan bagian tidak larut *wash-benzena*. Partisi ini dimaksudkan untuk menyari senyawa-senyawa yang lebih

polar agar masuk dalam fraksi tidak larut *wash-benzena*. Pemilihan pelarut *wash-benzena* berdasarkan uji pendahuluan yang telah dilakukan dengan berbagai macam pelarut, seperti n-heksana, kloroform, dan etil asetat. Hasil menunjukkan bahwa ekstrak kloroform yang dipartisi dengan *wash-benzena* memberikan profil yang berbeda (tidak tumpang tindih) antara bagian yang larut dan tidak larut *wash-benzena*, dibandingkan dengan tiga pelarut lainnya. Selanjutnya hasil partisi dipisahkan dengan partisi padat-cair menggunakan alat sentrifugasi dengan kecepatan 3000-5000 rpm selama 15 menit.

Prinsip metode sentrifugasi yang dilakukan di atas yaitu objek diputar secara horizontal pada jarak radial dari titik dimana titik tersebut dikenakan gaya. Pada saat objek diputar, partikel-partikel yang ada akan berpisah dan berpecah sesuai dengan berat jenis masing-masing partikel. Gaya yang berperan dalam proses teknik sentrifugasi ini yaitu gaya sentrifugal. Dengan adanya teknik ini, proses pengendapan suatu bahan akan lebih cepat dan optimum dibandingkan dengan menggunakan teknik biasa (manual). Prinsip sentrifugasi ini dapat bekerja secara optimum jika para pengguna dapat memasukkan nilai RPM dan nilai konsentrasi yang tepat ke dalam alat sentrifugasi (Putra 2008).

Tujuan sentrifugasi dalam penelitian ini adalah untuk memisahkan antara filtrat dan residu dari ekstrak kloroform daun ambre sehingga diperoleh hasil yang optimal yaitu bagian yang tidak mengendap yang merupakan bagian larut *wash-benzena* dan bagian yang mengendap merupakan bagian yang tidak larut *wash-benzena*. Setelah diperoleh dua bagian hasil partisi, kemudian dianalisis menggunakan KLT. Adapun kromatogram hasil partisi dengan *wash-benzena* tersaji pada Gambar 2.

Deteksi hasil KLT menggunakan sinar tampak, UV254, UV366, dan serum (IV) sulfat menunjukkan bahwa partisi dengan *wash-benzena* dapat memisahkan ekstrak kloroform menjadi dua bagian yang pemisahannya tidak saling tumpang tindih. Pada kromatogram hasil deteksi UV366, pada bagian larut *wash-benzena* terlihat adanya bercak pada Rf 0,53 (Gambar 2 C.1) sedangkan bagian tidak larut *wash-benzena* mempunyai bercak pada Rf 0,44 (Gambar 2 C.2). Hal ini menandakan kedua bagian tersebut mempunyai kandungan senyawa yang berbeda. Bagian larut *wash-benzena* dapat terelusi naik oleh fase gerak CHCl_3 yang bersifat lebih nonpolar dibandingkan bagian tidak larut *wash-benzena*.

Tahap selanjutnya kedua bagian hasil partisi diuji dengan BST (*Brine Shrimp Lethality Test*). Uji BST terhadap bagian larut *wash-benzena* dan tidak larut *wash-benzena* menggunakan tiga seri konsentrasi larutan uji (250, 500, dan 1000 $\mu\text{g/mL}$) dengan tiga replikasi. Hal ini bertujuan untuk mengetahui persentase kematian dari kedua partisi. Adapun hasil uji BST bagian larut *wash-benzena* dan tidak larut *wash-benzena* dapat dilihat pada Tabel 1.

Berdasarkan *bioassay guided partition* menggunakan *Brine Shrimp Lethality Test* (BST), bagian larut *wash-benzena* memberikan persentase kematian yang lebih besar dari bagian tidak larut *wash-benzena* (Tabel 1). Hal ini berarti senyawa teraktif berdasarkan metode BST berada

pada bagian larut *wash-benzena* yang selanjutnya akan difraksi lebih lanjut.

Fraksinasi dan Uji Brine Shrimp Lethality Test (BST)

Bagian larut *wash-benzena* sebagai bagian aktif selanjutnya difraksinasi untuk memisahkan kandungan senyawa-senyawa didalamnya berdasarkan polaritasnya. Fraksinasi dilakukan menggunakan kromatografi kolom yang bertujuan untuk memisahkan komponen-komponen senyawa kimia agar lebih sederhana.

Sampel uji berupa bagian larut *wash-benzena* (5,9 gram) dari daun ambre dielusi dengan berbagai perbandingan tertentu dari berbagai pelarut berdasarkan gradien polaritas, dimulai dari yang nonpolar hingga polar dengan cara menaikkan tingkat kepolarannya. Fase gerak yang digunakan terdiri dari *wash-benzena*, etil asetat, kloroform dan metanol dengan komposisi pelarut seperti terlihat pada Tabel 2. Eluen yang turun berupa pita-pita warna dengan laju yang berlainan dan ditampung sebagai fraksi. Fraksinasi dengan kromatografi kolom ini menghasilkan sembilan fraksi yang dapat dilihat pada Tabel 2.

Hasil fraksinasi yang didapat kemudian dianalisis dengan menggunakan KLT. Profil kandungan kimia dideteksi dengan menggunakan sinar UV254 dan sinar UV366 dan pereaksi semprot serum (IV) sulfat. Profil KLT masing-masing fraksi hasil fraksinasi dapat dilihat pada Gambar 3.

Berdasarkan profil kandungan kimia pada gambar 3, fraksi-fraksi dengan profil KLT yang hampir sama dijadikan ke dalam satu fraksi dengan asumsi bahwa fraksi-fraksi tersebut memiliki kandungan senyawa yang hampir sama. Kesembilan fraksi yang diperoleh kemudian dikelompokkan menjadi 4 fraksi yaitu fraksi I (gabungan fraksi 1, 2 dan 3) dengan berat 97 mg, fraksi II (gabungan fraksi 4, 5 dan 6) dengan berat 371 mg, fraksi III (fraksi 7) dengan berat 94 mg dan fraksi IV (gabungan fraksi 8 dan 9) dengan berat 10 mg. Profil KLT hasil penggabungan fraksi-fraksi dapat dilihat pada Gambar 4.

Langkah berikutnya fraksi-fraksi tersebut diuji potensi ketoksikannya terhadap *A. salina* untuk mengetahui fraksi mana yang paling toksik. Konsentrasi sampel yang digunakan adalah 250, 500 dan 1000 $\mu\text{g/mL}$. Dalam uji ini, hewan uji yang digunakan adalah *A. salina* yang berumur 48 jam, yang dinamakan *nauplius*. Hasil uji toksisitas masing-masing fraksi dan perhitungan nilai LC50-24jam dapat dilihat pada Tabel 3.

Berdasarkan tabel 3 dapat diketahui bahwa fraksi yang paling toksik adalah fraksi IV karena mempunyai nilai persentase kematian terbesar pada semua seri konsentrasi yang diujikan. Nilai rata-rata persentase kematian fraksi IV yang peroleh selanjutnya diubah menjadi nilai probit dengan menggunakan tabel probit (perhitungan tidak ditunjukkan), kemudian dibuat kurva hubungan antara log konsentrasi (x) dan nilai probit (y) sehingga diperoleh persamaan garis lurus yang dapat dilihat pada Tabel 4. Kurva hubungan antara log konsentrasi dan nilai probit larva *A. salina* dapat dilihat pada Gambar 5.

Berdasarkan persamaan garis lurus dari masing-masing replikasi dapat ditentukan nilai LC50-24 jam dengan cara

memasukkan nilai $y = 5$ ke dalam persamaan garis lurus, sehingga diperoleh log konsentrasi yang menyebabkan 50% kematian. LC50 menunjukkan konsentrasi yang menyebabkan kematian pada 50% hewan uji. LC50 merupakan indikasi untuk toksisitas senyawa. Harga LC50 yang diperoleh mencerminkan toksisitas bahan terhadap hewan uji. Semakin besar harga LC50 berarti toksisitasnya semakin kecil dan sebaliknya semakin kecil harga LC50 maka semakin besar toksisitasnya.

Menurut Meyer et al. (1982), senyawa uji dikatakan toksik jika harga LC50 lebih kecil dari 1000 $\mu\text{g/mL}$. Hasil perhitungan diperoleh harga LC50-24 jam rata-rata dari kedua replikasi sebesar 776,46 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi IV bersifat toksik. Meskipun uji toksisitas dengan BST tidak dapat secara langsung menggambarkan kemampuan toksiknya terhadap sel kanker tertentu, namun metode ini sudah banyak dilaporkan bermanfaat untuk uji skrining senyawa aktif antikanker (Astuti et al. 2005). Hasil penelitian pada senyawa metabolit sekunder dari *Eucheuma alvarezii* diketahui bersifat toksik terhadap *A. salina*. Nilai LC50 dari ekstrak *E. alvarezii* yang terlarut dalam metanol adalah 23,33 ppm dan LC50 dari ekstrak *E. alvarezii* yang terlarut dalam kloroform adalah 89,74 ppm. Dari hasil penghitungan LC50 tersebut menunjukkan bahwa tanaman *E. alvarezii* dapat berpotensi sebagai antikanker (Nurhayati et al. 2006). Penelitian awal pada uji sitotoksik ekstrak etanol daun *Swietenia mahagoni* dengan uji BST menunjukkan nilai LC50 sebesar 6,61 $\mu\text{g/mL}$ dan berpotensi sebagai kandidat antikanker (Akbar et al. 2009).

Tabel 1. Hasil uji BST bagian larut wash-benzena dan tidak larut wash-benzena daun amber

Sampel uji	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata % kematian
Bagian larut wash-benzena	1000	52
	500	36
	250	17
Bagian tidak larut wash-benzena	1000	33
	500	22
	250	11
Kontrol	1000	0
	500	0
	250	0

Tabel 4. Persamaan regresi linier dan perhitungan nilai LC50-24 jam fraksi IV hasil fraksinasi dari bagian larut wash-benzena daun Ambre

Replikasi	Persamaan regresi linier	LC50 ($\mu\text{g/mL}$)
I	$y = 1,113x + 1,786$ $r^2 = 0,983$	758,58
II	$y = 1,029x + 1,98$ $r^2 = 0,972$	794,33
LC50-24jam rata-rata		776,46

Tabel 2. Fase gerak yang digunakan dalam fraksinasi bagian larut wash-benzena daun ambre

Fraksi	Fase gerak
1	Wash Benzena
	Wash Benzena: Kloroform (15:1 v/v)
	Wash Benzena: Kloroform (10:1 v/v)
	Wash Benzena: Kloroform (5:1 v/v)
	Wash Benzena: Kloroform (3:1 v/v)
2	Wash Benzena: Kloroform (1:1 v/v)
	Wash Benzena: Kloroform (1:3 v/v)
	Wash Benzena: Kloroform (1:5 v/v)
3	Wash Benzena: Kloroform (1:10 v/v)
	Kloroform
	Kloroform: Etil Asetat (10:1 v/v)
	Kloroform: Etil Asetat (5:1 v/v)
4	Kloroform: Etil Asetat (3:1 v/v)
	Kloroform: Etil Asetat (1:1 v/v)
5	Kloroform: Etil Asetat (1:3 v/v)
6	Kloroform: Etil Asetat (1:5 v/v)
7	Kloroform: Etil Asetat (1:10 v/v)
8	Etil Asetat
9	Metanol

Tabel 3. Hasil uji toksisitas fraksi daun ambre terhadap *A. salina*

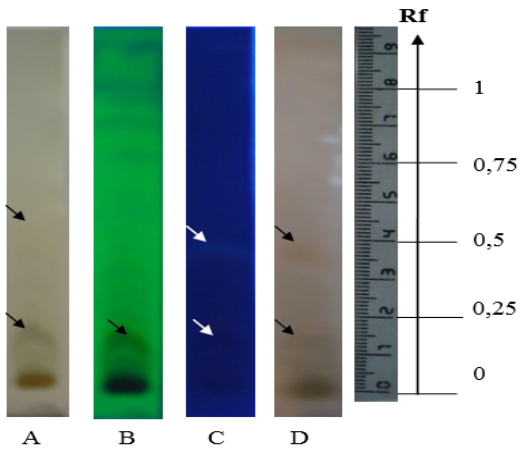
Sampel uji	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Replikasi (% kematian)	
		1	2
Fraksi I	250	16	8
	500	18	20
	1000	32	26
Fraksi II	250	14	22
	500	26	36
	1000	36	38
Fraksi III	250	26	28
	500	34	38
	1000	38	46
Fraksi IV	250	30	30
	500	40	38
	1000	56	54
Kontrol	250	0	0
	500	0	0
	1000	0	0

Keterangan: Blok hitam: Data yang menunjukkan persentase kematian yang potensial untuk uji selanjutnya

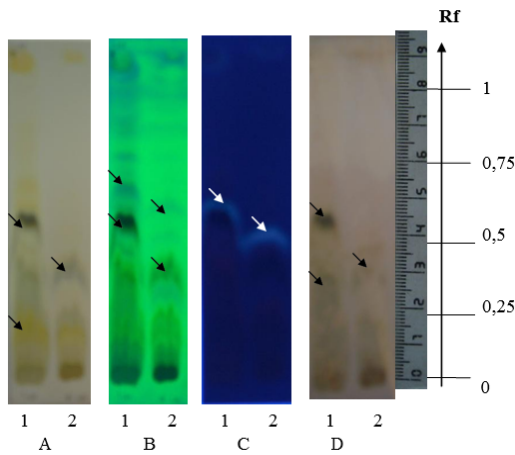
Tabel 5. Hasil KLT kromatogram fraksi IV daun Ambre

Rf	Penampakan Bercak					
	UV254	UV366	VA	LB	DD	Fe Cl3
0,16	-	-	ungu	-	-	-
0,44	-	-	ungu	-	-	Biru
0,58	-	-	-	-	-	Biru
0,68	peredaman	berpendar	-	-	-	-
0,85	-	-	ungu	-	-	-

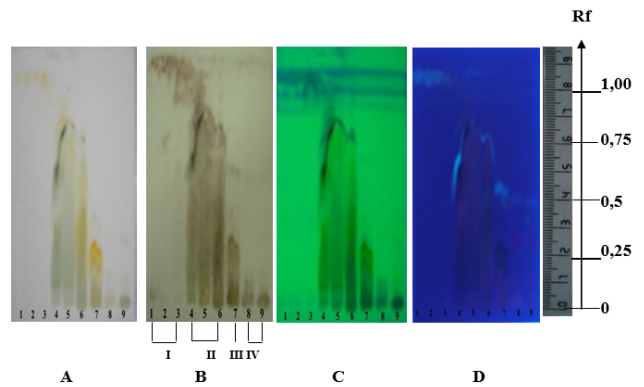
Keterangan: VA = Vanilin - asam sulfat; LB = Lieberman-Burchard; DD = Dragendorff



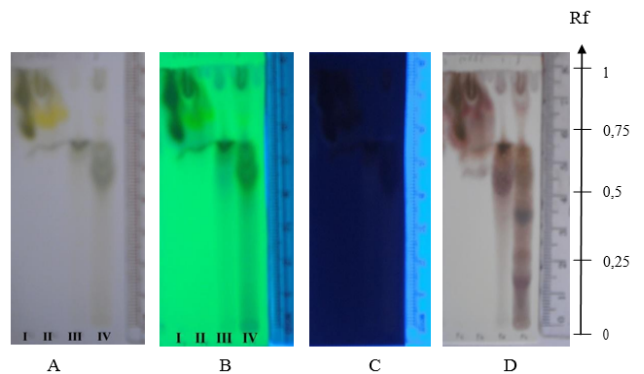
Gambar 1. Kromatogram hasil KLT ekstrak kloroform daun amber. Keterangan: Deteksi dengan (A) sinar tampak; (B) UV254; (C) UV366; (D) Serum (IV) Sulfat; Fase diam: Silika Gel GF254, Fase gerak: Kloroform (CHCl₃), Jarak pengembangan: 8 cm



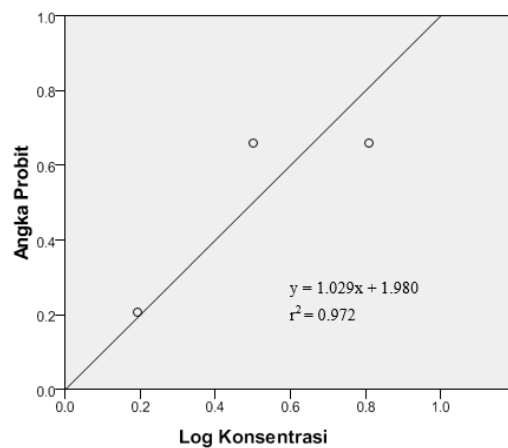
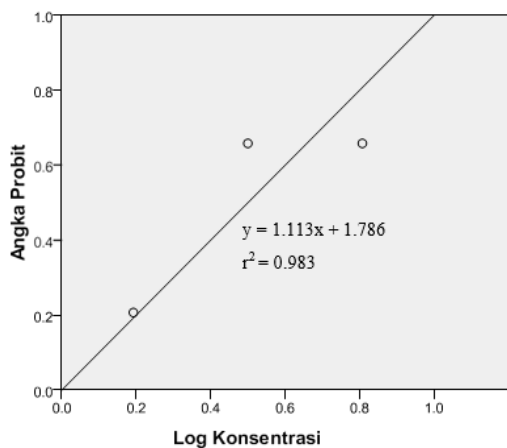
Gambar 2. Kromatogram hasil KLT Partisi ekstrak kloroform daun ambre deteksi dengan (A) sinar tampak; (B) UV254; (C) UV366; (D) serum(IV) sulfat. Keterangan: 1. Larut *wash-benzena*, 2. Tidak larut *wash-benzena*. Fase diam: Silika Gel GF254, Fase gerak: Kloroform (CHCl₃), Jarak pengembangan: 8 cm



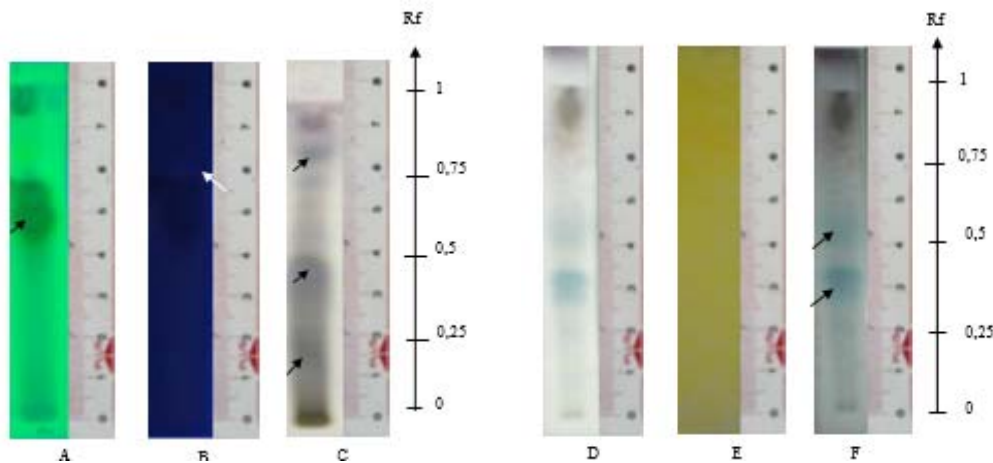
Gambar 3. Profil kromatogram masing-masing fraksi hasil fraksinasi dari partisi larut *wash-benzena* ekstrak kloroform daun ambre dengan deteksi (A) Sinar tampak /visible; (B) Serum (IV) sulfat; (C) UV254; (D) UV366. Fase diam: Silika gel 60 GF254, Fase gerak: Kloroform, Jarak pengembangan: 7 cm



Gambar 4. Profil kromatogram penggabungan fraksi daun ambre dengan deteksi Sinar tampak/visible, (B) UV254, (C) UV366, (D) serum (IV) sulfat. Keterangan: Fraksi 1,2,3 menjadi fraksi I, fraksi 4,5,6 menjadi fraksi II, fraksi 7 menjadi fraksi III, fraksi 8,9 menjadi fraksi IV. Fase diam: Silika gel 60 GF254, Fase gerak: Kloroform, Jarak pengembangan: 7 cm



Gambar 5. Kurva regresi linier hasil uji toksisitas fraksi IV hasil fraksinasi bagian larut *wash-benzena* daun Ambre terhadap *A. salina* replikasi I (kiri) dan replikasi II (kanan)



Gambar 6. Profil kromatogram fraksi IV daun Ambre dengan berbagai pereaksi penampak bercak. (A) UV254, (B) UV366, (C) Vanilin-asam sulfat, (D) Liebermann Burchard, (E) Dragendorff, dan (F) FeCl₃. Fase diam: Silika gel 60 GF254, Fase gerak: kloroform:etil asetat 1:3 (v/v), Jarak pengembangan: 7 cm

Deteksi golongan senyawa kimia fraksi teraktif

Golongan senyawa yang terkandung dalam fraksi teraktif (fraksi IV) kemudian dianalisis menggunakan metode KLT dengan beberapa pereaksi penampak bercak. Deteksi menggunakan sinar UV254, sinar UV366 dan beberapa pereaksi penampak bercak, yaitu Dragendorff, Vanilin-asam sulfat (Vanilin H₂SO₄), FeCl₃ dan Liebermann Burchard.

Pereaksi semprot yang digunakan diantaranya FeCl₃ untuk mendeteksi senyawa golongan fenol dengan respon positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna hijau sampai kelabu (Nurhayati et al. 2009). Vanilin H₂SO₄ untuk mendeteksi keberadaan senyawa terpenoid dengan respon positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna menjadi biru sampai ungu (Sulistijowati dan Gunawan 2001). Deteksi dengan pereaksi semprot Liebermann Burchard akan menunjukkan warna merah atau merah muda yang menandakan hasil positif untuk senyawa terpenoid dan terbentuknya warna biru atau hijau untuk hasil positif senyawa steroid (Lenny 2006).

Hasil deteksi bercak pada kromatogram menggunakan deteksi sinar tampak, sinar UV dan pereaksi semprot spesifik pada fraksi IV daun Ambre disajikan pada Tabel 5.

Profil KLT hasil fraksi IV hasil fraksinasi daun Ambre dengan berbagai deteksi penampak bercak dapat dilihat pada Gambar 6.

Hasil KLT menunjukkan bahwa hasil deteksi dengan sinar UV254 (Gambar 12.A) memperlihatkan terjadinya peredaman yang ditandai dengan adanya beberapa bercak yang berwarna gelap berlatar belakang fluoresensi hijau. Peredaman yang terjadi pada UV254 ini menunjukkan adanya suatu senyawa. Deteksi dengan sinar UV366 (Gambar 12.B) memperlihatkan adanya bercak yang berfluoresensi. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki ikatan rangkap terkonjugasi yang panjang sehingga dapat berpendar pada penyinaran dengan UV gelombang panjang.

Pemeriksaan alkaloid

Pelarut pengembang yang digunakan pada KLT untuk analisis alkaloid adalah kloroform: etil asetat (1:3 (v/v)). Plat disemprot dengan pereaksi Dragendorff dan kemudian dikeringkan dengan suhu 110 °C selama 10 menit. Hasil kromatogram tidak menunjukkan adanya bercak berwarna coklat jingga (Gambar 12.E). Alkaloid dan basa nitrogen akan menunjukkan bercak berwarna coklat jingga berlatar belakang kuning setelah disemprot dengan pereaksi Dragendorff (Santosa 2005). Berdasarkan hasil yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa di dalam fraksi IV daun Ambre tidak terdapat senyawa golongan alkaloid.

Pemeriksaan fenolik

Hasil deteksi dengan pereaksi semprot FeCl₃ menunjukkan hasil yang positif ditandai dengan perubahan warna totalan sampel fraksi menjadi biru, dengan Rf 0,44 dan 0,58 (Gambar 12.F), yang menunjukkan bahwa kandungan senyawa dalam fraksi IV daun Ambre terdapat golongan senyawa fenolik. Pereaksi semprot FeCl₃ merupakan cara klasik deteksi senyawa fenol sederhana yang menimbulkan warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam yang kuat, tetapi kebanyakan fenol (terutama flavonoid) dapat dideteksi pada kromatogram berdasarkan warnanya atau fluoresensinya di bawah lampu UV, warnanya diperkuat atau berubah bila diuapi amonia. Senyawa fenol merupakan senyawa aromatik sehingga menunjukkan serapan kuat di daerah spektrum UV (Harborne, 1987). Hal ini dapat dilihat pada Gambar 12.B, dimana pada spektrum UV366 tampak bercak biru sehingga dapat disimpulkan bahwa di dalam fraksi IV terdapat senyawa golongan fenolik.

Pemeriksaan terpenoid

Pelarut pengembang yang digunakan pada KLT untuk analisis terpenoid adalah kloroform: etil asetat (1:3 (v/v)). Pemeriksaan terpenoid dilakukan dengan menggunakan Vanilin-asam sulfat. Plat disemprot yang dengan pereaksi

tersebut kemudian dikeringkan dengan suhu 110 °C selama 10 menit. Pemeriksaan terpenoid menggunakan pereaksi Vanilin-asam sulfat, bila terdapat terpenoid maka akan menunjukkan bercak berwarna antara biru sampai ungu (Sulistijowati dan Gunawan 2001). Pada hasil kromatogram menunjukkan adanya bercak berwarna ungu pada Rf 0,16; 0,44; dan 0,85 (Gambar 12.C), sehingga dapat disimpulkan bahwa fraksi IV mengandung senyawa terpenoid.

Deteksi senyawa dengan pereaksi Liebermen-Burchad digunakan untuk mendeteksi keberadaan senyawa triterpenoid (steroid) dengan hasil positif warna kuning jingga. Dari hasil pemeriksaan menunjukkan tidak adanya perubahan warna menjadi kuning jingga (Gambar 12.D). Hal ini memberikan hasil yang negatif, sehingga fraksi IV tersebut tidak mengandung senyawa triterpenoid (steroid).

Hasil pemeriksaan fenolik dengan pereaksi semprot FeCl₃ dan pemeriksaan terpenoid dengan Vanilin-asam sulfat menunjukkan hasil yang positif. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa fraksi IV mengandung senyawa terpenoid dan fenolik.

Hasil penelitian efek toksisitas komponen bioaktif daun Lobak (*Raphanus sativus* Landra. var. *hortensis* Back.) menunjukkan fraksi tidak larut asetonitril mempunyai efek toksisitas tertinggi terhadap *A. salina* dengan nilai LC₅₀₋₂₄ jam sebesar 90,54 µg/mL. Senyawa toksik yang terdapat dalam fraksi tidak larut asetonitril daun Lobak yang diduga ikut bertanggungjawab menyebabkan kematian larva *Artemia salina* Leach. adalah golongan senyawa fenolik (Khoiriyah 2009). Senyawa fenolik dilaporkan mempunyai sejumlah aktifitas biologis termasuk antioksidan. Menurut Zhai (1998) terdapat hubungan antara proses terjadinya kanker (karsinogenesis) dengan senyawa antioksidan yang erat kaitannya dengan kerusakan oksidatif DNA. Dengan menekan reaksi oksidatif radikal bebas, kerusakan mitokondria sebagai organel penyedia energi dalam sel dapat dicegah. Antioksidan dapat melindungi disfungsi mitokondria dan gangguan lain yang dapat menyebabkan penyakit lain (Poon et al. 2004).

Hasil uji toksisitas fraksi VI dari fraksinasi fraksi larut etil asetat ekstrak kloroform daun Rumput Mutiara (*Hedyotis corymbosa* (L.) Lamk.) menunjukkan toksisitas paling tinggi terhadap *A. salina* Leach dengan nilai LC₅₀₋₂₄ jam = 281,77 µg/mL dan berpotensi untuk diteliti lebih lanjut ke arah senyawa antikanker. Pada fraksi VI tersebut ditemukan senyawa golongan alkaloid, flavonoid, terpenoid dan senyawa *Ursolic acid* (Murdiyono 2008). Senyawa *Ursolic acid* termasuk dalam golongan senyawa triterpenoid. Senyawa *Ursolic acid* mempunyai efek antiproliferatif dan antivirus terhadap sel kanker servik (Yim et al. 2006), selain itu *ursolic acid* dan 2 α -hydroxy*ursolic acid* dapat menghambat aktivitas pertumbuhan empat sel tumor yaitu HL-60, BGC, Bel-7402 dan Hela (Ma et al. 2005).

Penelitian lain yang dilakukan oleh Moulisha et al. (2009) pada hasil isolasi dari buah *Dregea volubilis* ditemukan kandungan senyawa taraxeron yang termasuk golongan senyawa triterpenoid. Senyawa tersebut menunjukkan aktivitas antikanker pada sel leukimia K 562. Sun et al. (2007) menemukan adanya senyawa

Cimicifoetisida A dan B dari rhizoma *Cimicifunga foetida* yang merupakan senyawa golongan triterpenoid. Hasil uji sitotoksitas yang dilakukan, menunjukkan bahwa dua senyawa golongan triterpenoid tersebut dapat menghambat proliferasi sel kanker, yaitu EAC (*Ehrlich Ascites Carcinoma*) dan MDA-MB-A231 (sel kanker payudara).

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Wu et al. (2004) menunjukkan sebagian besar kandungan bioaktif dari genus tanaman *Aristolocha* adalah golongan senyawa terpenoid. Pada tanaman *Aristolocha indica* memiliki kandungan senyawa bioaktif diantaranya (S)-Linalool dan α -terpinolene yang merupakan golongan monoterpenoid, serta α -humulene dan β -caryophyllene yang merupakan golongan sesquiterpenoid. Hasil uji pada tanaman *Aristolocha indica* menunjukkan adanya aktivitas antitumor dan diduga senyawa bioaktif dari kedua golongan terpenoid inilah yang bertanggung jawab.

Pemeriksaan beberapa golongan senyawa dari penelitian ini menunjukkan bahwa dalam fraksi IV daun ambre mengandung senyawa terpenoid dan fenolik. Kedua senyawa yang berhasil dideteksi tersebut dapat dikatakan sebagai golongan senyawa yang ikut bertanggung jawab terhadap kematian *A. salina* dan diduga merupakan senyawa yang dapat berpotensi sebagai antikanker. Namun tidak menutup kemungkinan ada golongan senyawa lain yang ikut bertanggung jawab terhadap efek toksik *A. salina* yang belum terdeteksi. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan teknik purifikasi (pemurnian) seperti KLT preparatif atau kromatografi filtrasi gel dengan fase diam dan fase gerak tertentu serta atau purifikasi dengan alat *Gas Chromatography* (kromatografi gas). Penggunaan kromatografi sangat membantu dalam pendeteksian senyawa metabolit sekunder dan dapat dijadikan patokan untuk proses pengerjaan berikutnya dalam penentuan struktur senyawa. Metode identifikasi dan elucidasi struktur senyawa kimia dapat dilakukan dengan menggunakan alat Spektrofotometer Inframerah (IR), Spektrofotometer Resonansi Magnetik Inti ¹H (¹H NMR) dan Spektroskopi Massa (Lenny 2006).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, maka dapat disimpulkan bahwa: Hasil uji toksisitas fraksi IV dari hasil fraksinasi dari partisi larut *wash- benzena* ekstrak kloroform daun ambre menunjukkan toksisitas paling tinggi terhadap *A. salina* Leach dengan nilai LC₅₀₋₂₄ jam = 776,46 µg/mL dan berpotensi untuk diteliti lebih lanjut ke arah senyawa antikanker. Pada fraksi IV daun ambre ditemukan senyawa golongan terpenoid (Rf = 0,16; 0,44; 0,85) dan fenolik (Rf = 0,44; 0,58) yang diduga merupakan senyawa yang berpotensi sebagai antikanker.

DAFTAR PUSTAKA

- Asuti P, Utami S, Pratiwi T, Hertiani T, Alam G, Tahir A, Wahyono S. 2005. Antimicrobial activity screening of marine sponges extracts collected from Barang Lomposea. *J Trad Med* (10): 32.
- Cannell RJP (Ed), 1998, How to approach the isolation of a natural product. In: Cannell RJP (ed.). *Methods in Biotechnology*. Vol. 4: Natural Products Isolation, Humana, Totowa, NJ.
- Carballo JL, Inda ZLH, Perez P, Gravalos MDG. 2002. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *Biotechnology* 2 (17): 1-5.
- Cutler SJ, Cutler HG. 2000. *Biologically Active Natural Product: Pharmaceutical*. CRC Press, London.
- Harborne JB. 1987. *Metode Fitokimia edisi II*. ITB Press, Bandung.
- Hargono D, Farouq, Sutarno S, Pramono S, Rahayu TR, Tanuatmadja US, Sumarsono. 1986. *Sediaan Galenik*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Indrayani L, H Soetjipto, L Sihasale. 2006. Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Berkala Penelitian Hayati* (12): 57-61.
- Khoiriyah Y N. 2009. Efek Toksisitas Komponen Bioaktif Daun Lobak (*Raphanus sativus* L. var. *hortensis* Back.) dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test sebagai Kandidat Antikanker dan Profil Kromatografi Lapisnya [Skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Lenny S. 2006. Isolasi dan Uji Bioaktivitas Kandungan Kimia Utama Puding Merah (*Gruptophyllum pictum* L. Griff) dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BST). [Skripsi]. Universitas Sumatera Utara, Sumatera.
- Ma CM, Cai SQ, Cui JR, Wang RQ, Tu PF, Hattori M, Daneshtalab M. 2005. The cytotoxic activity of ursolic acid derivated. *Eur J Med Chem* 40 (06): 582-589
- McLaughlin JL. 1991. Crown gall tumours on potato disc and brine shrimp lethality: two simple bioassay for higher plant screening and fractionation. *Meth Plants Biochem* 6 (1): 1-30.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* 45 : 31-34
- Moulissha B, Bikash MN, Partha P, Kumar GA, Sukdeb B, Kanti HP. 2009. In vitro anti-leishmanial and anti-tumour activities of a pentacyclic triterpenoid compound isolated from the fruits of *Dregea volubilis* Benth Asclepiadaceae. *Trop J Pharmaceut Res* 8 (2): 127-131.
- Murdiyono T. 2008. Uji Toksisitas Hasil Fraksinasi Daun Rumpun Mutiara (*Hedyotis corymbosa* (L.) Lamk.) Terhadap *Artemia salina* Leach. dan Profil Kandungan Kimia Fraksi Teraktif [Skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Nurhayati APD, Abdulgani N, Febrianto R. 2006. Uji Toksisitas Ekstrak *Eucheuma Alvarezii* terhadap *Artemia salina* sebagai Studi Pendahuluan Potensi Antikanker. *Akta Kimindo* 2 : 41- 46.
- Nurhayati, Fachriyah NE, Kusriani D. 2009. Isolasi, Identifikasi dan Uji Toksisitas Senyawa Flavonoid Trak Etil Asetat Rimpang Lengkuas Merah (*Alpinia galanga* L. Wild). Jurusan Kimia Universitas Diponegoro, Semarang.
- Poon HF, Calabrese V, Butterfield DA. 2004. Free radicals and brain aging. *Clinical Geriatri Medical* 20: 329-359
- Putra I. 2008. Artikel Ilmiah: Sentrifugasi, Metode Terpenting dalam Penelitian. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Rakhmawati R, Anggarwulan E, Retnaningtyas E. 2009. Potency of lobak leaves (*Raphanus sativus* L. var. *hortensis* Back) as anticancer and antimicrobial candidates. *Biodiversitas* 10 (3): 158-162.
- Santosa CM, Hertiani T. 2005. Kandungan senyawa kimia dan efek ekstrak air daun bangun-bangun (*Coleus amboinicus* L.) pada aktivitas fagositosis netrofil tikus putih (*Rattus norvegicus*). *Majalah Farmasi Indonesia* 16 (3): 141 - 148.
- Sulistijowati A, Gunawan D. 2001. Efek ekstrak daun kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) terhadap *Candida albicans* serta profil kromatografinya. *Cermin Dunia Kedokteran* (130): 32-36.
- Sun L, Qing C, Zhang Y, Jia S, Li Z, Pei S, Qiu M, Gross M L, Qiu S X. 2007. Cemicifoetisides glycosides from the rhizomes of *Cimicifuga foetida*, inhibit proliferation of cancer cells. *Beilstein J Chem* 3 (3). DOI: 10.1186/1860-5397-3-3
- Wahyuni DSC, Rakhmawati R. 2008. Skrining Toksisitas Beberapa Tanaman di Kawasan Tawangmangu Surakarta dan Profil Kandungan Kimianya. Laporan Penelitian Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Sebelas Maret Surakarta.
- Wahyuningsih MSH, Wahyuono S, Santoso D, Setiadi J, Soekotjo, Widiastuti SM, Rakhmawati R, Wahyuni DSC. 2008. Eksplorasi Tumbuhan Dari Hutan Kalimantan Tengah Sebagai Sumber Senyawa Bioaktif. *Biodiversitas* 9 (3):169-172.
- Wu T, Damu A G, Rensu C, Kuo P C. 2004. Terpenoids of *Aristolochia* and their Biological Activities. *Natural Product*. Departement of Chemistry National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan.
- Yim EK, Lee MJ, Lee KH, Um SJ, Park JS. 2006. Antiproliferatif and antiviral mechanism of ursolic acid and dexamethasone in cervical carcinoma cell line. *Intl J Gynecol Cancer* (16): 2023-2031.
- Zhai S, Dai R, Friedman F, Vestal R. 1998. Comparative inhibition of human Cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids. *Drug Metabol Dispos* 26 (10) 989-989.