



LAPORAN PENELITIAN
DIP UNIVERSITAS AIRLANGGA
TAHUN ANGGARAN 1999/2000

ISOLASI DAN UJI SITOTOKSIK SENYAWA TRITERPEN DARI KULIT BATANG MAHONI (*SWIETENIA MAHAGONI* (L) JACQ)



Peneliti :

Drs. SUKARDIMAN, Apt., MS.

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh : DIP Universitas Airlangga 1999/2000
Nomor SK. Rektor 8402/J03/PP/1999
Nomor Urut : 35

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Februari, 2000

3000134003141

IR - Perpustakaan Universitas Airlangga



1. TRITERPENES.
2. CYTOTOXINS.

IR - Perpustakaan Universitas Airlangga



LAPORAN PENELITIAN
DIP UNIVERSITAS AIRLANGGA
TAHUN ANGGARAN 1999/2000

KK B
KK-2B
583.77
Suk
I - 2

ISOLASI DAN UJI SITOTOKSIK SENYAWA TRITERPEN DARI KULIT BATANG MAHONI (SWIETENIA MAHAGONI (L) JACQ)

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Peneliti :

Drs. SUKARDIMAN, Apt., MS.



013400141

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh : DIP Universitas Airlangga 1999/2000
Nomor SK. Rektor 8402/J03/PP/1999
Nomor Urut : 35

7000134003141
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Februari, 2000



DEPARTEMEN PERPUSTAKAAN DAN BUDAYAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
LEMBAGA PENELITIAN

- | | | |
|--------------------------------------|--------------------------------------|--|
| 1. Puslit Pembangunan Regional | 5. Puslit Pengembangan Gizi(5995720) | 9. Puslit Kependudukan dan Pembangunan (5995719) |
| 2. Puslit Obat Tradisional | 6. Puslit/Studi Wanita (5995722) | 10. Puslit / Kesehatan Reproduksi |
| 3. Puslit Pengembangan Hukum | 7. Puslit Olahraga | |
| 4. Puslit Lingkungan Hidup (5995718) | 8. Puslit Bioenergi | |

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115 — Telp. (031) 5995246, 5995248, 5995247 Fax. (031) 5995246
 E-mail: lpunair@rad.net.id — http://www.geocities.com/Athens/Olympus/6223

IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN

1. a. Judul Penelitian : Isolasi dan Uji Sitotoksik Senyawa Triterpen dari Kulit Batang Mahoni (Swietenia mahagoni (L) Jacq)
- b. Macam Penelitian : (V) Fundamental, () Terapan, () Pengembangan, () Instiusional
- c. Katagori Penelitian : (V) I () II () III () IV
2. Kepala Proyek Penelitian
- a. Nama Lengkap dan Gelar : Drs. Sukardiman, M.S.
- b. Jenis Kelamin : Laki-Laki
- c. Pangkat/Golongan dan NIP: Pena ta Tk.I / III d / 131 801 629
- d. Jabatan Sekarang : Staf Pengajar
- e. Fakultas/Puslit/Jurusan : Farmasi
- f. Univ./Inst. /Akademi : Universitas Airlangga
- g. Bidang Ilmu Yang Diteliti : Farmakognosi
3. Jumlah Tim Peneliti : 1 (Satu) orang
4. Lokasi Penelitian : Lab. Botanifarmasi – Farmakognosi Unair
5. Kerjasama dengan Instansi Lain
- a. Nama Instansi : -
- b. A l a m a t : -
6. Jangka Waktu Penelitian : 6 (Enam) bulan
7. Biaya Yang Diperlukan : Rp 3.750.000,00
8. Seminar Hasil Penelitian
- a. Dilaksanakan Tanggal : 29 Februari 2000
- b. Hasil Penelitian : () Baik Sekali (V) Baik
 () S e d a n g () K u r a n g

Surabaya, 29 Februari 2000



Mengetahui/Mengesahkan:
 a.n. Rektor
 Ketua Lembaga Penelitian,

Prof. Dr. Noor Cholies Zaini
 NIP. 130 355 372

RINGKASAN

ISOLASI DAN UJI SITOTOKSIK SENYAWA TRITERPEN DARI KULIT BATANG MAHONI (*SWIETENIA MAHAGONI* (L) JACQ)

(Sukardiman, 1999, 30 halaman)

Penelitian ini dilakukan untuk menjawab permasalahan (1) Apakah dari kulit batang mahoni dapat diisolasi dan diidentifikasi adanya senyawa triterpen (2). Apakah senyawa triterpen tersebut memiliki aktivitas sitotoksik terhadap bioindikator *Artemia salina* L. Sebagai upaya praskrining aktivitas biologik antikanker dari tanaman, khususnya senyawa triterpen yang terdapat dalam ekstrak heksan kulit batang mahoni. Salah satu uji sitotoksik yang dapat digunakan adalah uji toksisitas dengan menggunakan bioindikator larva *Artemia salina*, dengan mengamati efek mortalitas (kematian) setelah pemberian isolat tanaman tersebut. Jika pada uji tersebut menunjukkan aktivitas positif maka ada korelasi terhadap aktivitas antikanker apabila dilakukan penelitian lebih lanjut dengan uji in vitro maupun in vivo untuk bioaktivitas antikanker.

Tujuan penelitian ini adalah : (1) Melakukan isolasi dan identifikasi senyawa triterpen dari kulit batang tanaman mahoni. (2) Melakukan uji sitotoksik senyawa triterpen dari kulit batang tanaman mahoni dengan menggunakan bioindikator *Artemia salina* L.

Tahapan penelitian ini akan dilakukan dengan tahapan pembuatan serbuk kulit batang mahoni, pembuatan ekstrak heksan dengan metode maserari, dan isolasi triterpen dari ekstrak heksan dengan metode kolom kromatografi dengan fase diam silika gel dengan eluen heksan – etil asetat = 8 : 2. Uji aktivitas sitotoksik isolat dilakukan dengan bioindikator *Artemia salina* ditentukan dengan harga LD₅₀ yang ditentukan dengan *Finney Computer Program*, dimana isolat dinyatakan aktif jika harga LD₅₀ < dari 100 µg/ml.

Identifikasi isolat ditentukan dengan penentuan titik lebur Fisher John Melting Point Apparatus, uji kemurnian isolat digunakan dengan KLT dengan tiga eluen, sedangkan untuk penentuan struktur kimia senyawa triterpen digunakan spektrofotometri : UV, FTIR, MS, ¹H-¹³C NMR.

Dari 400 gram serbuk kulit batang diperoleh ekstrak heksan seberat 3 gram, dan hasil kolom kromatografi pada fraksi 28-43 yang dikumpulkan diperoleh kristal jarum seberat 45 mg dan dilakukan pemurnian dengan penarikan lemak dan zat warna dengan petroleum eter serta kristalisasi dengan heksan-metanol. Hasil isolat kristal jarum putih memiliki titik lebur 120,5 – 126,5°C.

Sedangkan untuk hasil identifikasi struktur kimia isolat dengan spektrofotometri : UV, FTIR, MS, ^1H - ^{13}C NM diduga sebagai senyawa triterpen tipe sikloartan yang diduga sebagai 4β -demetil-24-metilen sikloartanol .

Uji aktivitas biologi senyawa triterpen dengan uji toksisitas dengan *Artemia salina* menunjukkan adanya efek sitotoksik dengan harga LD_{50} sebesar 3.7302 $\mu\text{g/ml}$. Dengan hasil yang sangat aktif dari senyawa triterpen kulit batang mahoni yang diperoleh maka disarankan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap uji bioaktivitas antikankernya dengan menggunakan kultur sel kanker.

(L.P. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga , SK Rektor No: 8402/JO3/PP/1999)

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah swt yang telah memberikan rahmat dan hidayahnya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian ini dengan judul : **ISOLASI DAN UJI SITOTOKSIK SENYAWA TRITERPEN DARI KULIT BATANG MAHONI (*SWIETENIA MAHAGONI* L. JACQ).**

Pada kesempatan in peneliti menyampaikan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat **REKTOR UNIVERSITAS AIRLANGGA** yang telah mendukung penelitian ini.

Tak lupa pula penulis ucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Ketua Lembaga Penelitian Unair yang telah mendukung dan membantu penelitian ini.
2. Dekan Fakultas Farmasi Unair yang telah mengijinkan penggunaan fasilitas dan sarana Laboratorium.
3. Kepala Laboratorium Botanifarmasi-Farmakognosi.
4. Kepala Laboratorium Dasar Bersama.
5. Dra. Pratiwi P, MSi telah membantu menganalisis spektroskopi NMR.
6. Semua pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu.

Semoga amal ibadah Bapak / ibu dapat diterima oleh Allah swt.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan karya ilmiah ini kurang sempurna, oleh sebab itu peneliti mengharapkan kritik dan saran agar karya ilmiah ini menjadi lebih sempurna.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat bagi pembaca, khususnya peminat aktivitas bahan alam.

Surabaya, Januari 2000

Peneliti.

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PENGESAHAN	I
RINGKASAN	ii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR LAMPIRAN	
BAB. I. PENDAHULUAN	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	3
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	8
BAB IV. METODE PENELITIAN	9
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	14
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	26
DAFTAR PUSTAKA	27

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Skema rancangan penelitian	11
Gambar 2. Spektrum FTIR senyawa triterpen	17
Gambar 3. Spektrum H-NMR senyawa triterpen	18
Gambar 4. Spektrum C-NMR senyawa triterpen	20
Gambar 5. Spektrum Massa senyawa triterpen	21
Gambar 6. Struktur kimia 4-demetil-24 metilen sikloartanol	22

BAB I

PENDAHULUAN

Penyakit kanker masih merupakan penyebab kematian terbesar baik dinegara maju seperti Amerika ataupun dinegara berkembang seperti di Indonesia. Sehingga terus dikembangkan pencarian bahan bioaktif dari tanaman yang memiliki aktivitas antikanker yang selektif dan potensial. Dalam pelaksanaan penelitian tersebut diperlukan uji skrining aktivitas biologik yang tepat atau yang sesuai . Dan akhirnya dapat membedakan tumbuhan yang mempunyai prospek sebagai sumber bahan bioaktif antikanker , dengan demikian hanya tumbuhan tertentu yang akan diteliti lebih lanjut (Salmon. 1989 ; Mc.Lauglin.1987).

Salah satu skrining bahan bioaktif dari tanaman yang memiliki aktivitas antikanker dapat digunakan dengan uji toksisitas dengan menggunakan bioindikator larva *Artemia salina*, dengan mengamati efek mortalitas (kematian) ekstrak, fraksi atau isolat tanaman terhadap bioindikator tersebut. Penggunaan larva *Artemia salina* sebagai bioindikator didasarkan pada sifat khas biota tersebut, yaitu dapat menerima segala jenis bahan dan zat tanpa seleksi lebih dahulu, penggunaannya mudah, pengerjaannya cepat, tidak memerlukan tempat dan perlakuan secara aseptis, menggunakan sampel relatif sedikit. Serta metode ini merupakan metode yang digunakan oleh National Cancer Institute, Amerika Serikat untuk skrining bioaktivitas ekstrak, fraksi atau isolat tanaman khususnya senyawa bioaktif antikanker (Meyer.1982 ; Fransworth, 1966).



Tanaman mahoni (*Swietenia mahagoni* (L) Jacq) adalah tanaman pelindung jalan dari suku Meliaceae. Ada dua spesies *Swietenia* yang terdapat di Indonesia yaitu *Swietenia mahagoni* (L) Jacq dan *Swietenia macrophylla* (Hegnauer, 1966).

Penelitian terhadap kandungan kimia dan aktivitas biologi dari tanaman mahoni (*Swietenia mahagoni* (L) Jacq) telah dilakukan , antara lain biji mahoni mengandung tetranortriterpenoid yang terdiri antara lain : swietenin dan swietenolida dan memiliki aktivitas sebagai anti platelet agregasi (Ekimoto.1991 ; Katoda.1990).

Dan tahun 1999 Saudah telah melakukan uji sitotoksik ekstrak dari kulit batang tanaman mahoni (*Swietenia mahagoni* (L) Jacq) dengan menggunakan bioindikator *Artemia salina* L. Dari hasil tersebut diketahui bahwa ekstrak heksan kulit batang tanaman mahoni menunjukkan aktivitas sitotoksik yang sangat aktif dengan harga LD₅₀ 109,46 µg/ml. Dan hasil skrining kandungan kimia dari ekstrak heksan tersebut diketahui adanya kandungan senyawa golongan triterpenoid.

Sehingga pada penelitian ini akan dilakukan isolasi dan identifikasi senyawa triterpen dari kulit batang tanaman mahoni, serta melakukan uji sitotoksik triterpen tersebut dengan menggunakan bioindikator *Artemia salina* L. Tahapan penelitan ini akan dilakukan isolasi triterpen dari ekstrak heksan dengan metode kolom kromatografi, dan identifikasi isolat ditentukan dengan spektrofotometri : UV, FTIR, MS, ¹H -¹³C NMR. Dan untuk uji sitotoksik dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* dengan biondikator *Artemia salina*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

1. Tinjauan tentang Tanaman Mahoni

1.1. Klasifikasi tanaman

Tanaman Mahoni diklasifikasikan (Steenis, 1982):

Divisi	: Spermatophyta
Anak Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Bangsa	: Rutales
Suku	: Meliaceae
Marga	: <i>Swietenia</i>
Jenis	: <i>Swietenia mahagoni</i> L (Jacq)

Tanaman *Swietenia mahagoni* L (Jacq) atau mahoni merupakan tanaman yang berasal dari daerah tropik di Amerika. Di Jawa tanaman ini banyak tumbuh di daerah dataran yang kering, di tempat-tempat yang dekat dengan pantai dan banyak ditanam ditepi-tepi jalan sebagai perindang. Merupakan tanaman berkayu berupa pohon menahun dengan ketinggian 5-25 meter. Daun merupakan daun majemuk, bentuk bulat telur dengan ujung dan pangkal runcing, panjang 3 – 12 cm dan lebar 1,5 – 5 cm, pertulangan menyirip, tepi rata, bertangkai pendek dengan panjang 3 - 13 mm, ketika masih muda berwarna merah dan setelah tua hijau. Bunga majemuk dalam karangan di ketiak daun,

petal hijau kekuningan, panjang 3 – 4 mm, tangkai stamen 2-3 mm. Buah kotak, bulat telur, panjang 7,5 – 10 cm, berlekuk lima , berwarna coklat. Biji keras , pipih, hitam atau coklat dengan sayap yang panjangnya 4,5- 5,5 cm (Backer, 1965 ; Syamsuhidayat, 1991).

1.2. Kegunaan Tanaman

Digunakan sebagai obat terhadap diabetes, encok, obat eksim, masuk angin dan meningkatkan nafsu makan (Samsuhidayat. 1991, Mardiswoyo, 1968).

1.3. Kandungan Kimia

Kandungan kimia dari tanaman mahoni (*Swietenia mahagoni* (L) Jacq), antara lain biji mahoni mengandung 25 senyawa tetranortriterpenoid yang terdiri antara lain : swietenin dan swietenolida (Katoda,1990). Dan menurut Hegnauer (1966) tanaman mahoni juga mengandung senyawa triterpen tipe sikloartan yaitu sikloeukalenol (4 β -demetil-24-metilen sikloartanol).

2. Tinjauan tentang uji sitotoksik dengan metode " *Brine Shrimp Lethality Test*"

Uji kematian larva udang laut atau "*Brine Shrimp Lethality Test*" berprinsip pada hubungan antara toksikologi dan farmakologi.

Toksikologi adalah ilmu yang mempelajari tentang aksi berbahaya zat kimia atas jaringan hidup. Sedangkan farmakologi adalah ilmu yang mempelajari pengaruh zat kimia terhadap fungsi jaringan hidup. Toksikologi

adalah farmakologi sederhana pada dosis lebih tinggi atau sebaliknya, farmakologi adalah toksikologi sederhana pada dosis lebih rendah.

Larva udang laut *Artemia salina* Leach disiapkan dengan menempatkan sejumlah telur udang tersebut dalam air laut, maka setelah 48 jam telur udang tersebut menetas menjadi larva dan disebut nauplii yang dapat dipakai untuk penelitian. Senyawa bioaktif hampir selalu toksis pada dosis yang lebih tinggi. Maka dari itu, kematian hewan sederhana ini dapat digunakan sebagai suatu alat monitor untuk proses praskrining dan fraksinasi dalam penelitian produk bioaktif dari sumber alam. Larva udang laut sebelumnya telah digunakan dalam sejumlah sistem uji aktivitas. Kini dikembangkan untuk ekstrak tumbuhan, fraksi atau komponen murni dengan konsentrasi awal 10, 100, dan 1000 $\mu\text{g/ml}$ dalam botol putih 10 ml yang berisi 5 ml air laut dan 10 ekor larva udang.

Masing-masing konsentrasi disiapkan dalam 3 botol. Setelah dalam 24 jam jumlah larva udang yang masih hidup dihitung dan prosentase kematian dari masing-masing dosis dicatat. Selanjutnya data ini dianalisa dengan *Finney Computer Program* untuk mengetahui harga LD_{50} (*Lethality Dose 50%* yaitu dosis yang menyebabkan kematian sebesar 50% dari hewan coba) dengan derajat kepercayaan (interval confidence) 95%.

Dari hasil penelitian didapatkan adanya korelasi yang baik antara uji toksisitas terhadap larva udang atau "*Brine Shrimp Lethality Test*" dan uji 9-KB (Karsinoma nasofaring) telah diperoleh hasil bahwa nilai ED_{50} (*effective dose 50%* yaitu dosis yang memperlihatkan kesembuhan sebesar 50% hewan

percobaan) untuk sitotoksik secara umum kurang lebih sepersepuluh dari harga LD₅₀ dari uji kematian larva udang laut .

Sebagian besar tumbuhan yang mempunyai aktivitas pada uji BST mempunyai aktivitas juga pada uji sitotoksik dan 3-PS (Leukemia invivo). Hal ini memungkinkan pemakaian metode kematian larva udang sebagai alat monitor yang baik pada proses fraksinasi.

Dan pemakaian metode kematian larva udang laut (BST) ini mempunyai beberapa keuntungan, antara lain : waktu pelaksanaannya cepat, biaya relatif murah, pengerjaannya sederhana, tidak memerlukan teknik aseptis, tidak memerlukan peralatan khusus, menggunakan sampel yang relatif sedikit (Mc.Lauglin.,1991)

2.1. Klasifikasi dan daur hidup dari *Artemia salina* L.

Menurut Penak (1978) dan Dales (1981) mengatakan bahwa *Artemia salina* L adalah salah satu Crustaceae tingkat rendah yang termasuk dalam :

- Filum : Arthropoda
- Klas : Crustaceae
- Subklas : Branchiopoda
- Ordo : Anostraca
- Famili : Artemidae
- Genus : *Artemia*
- Spseies : *Artemia salina* Leach (Fuad, 1986)

Nama spesies ini diberikan oleh Schlosser yang menemukan *Artemia salina* pertama kali di danau air asin pada tahun 1955, dan *A. salina* ini dapat ditemukan di lima benua.

Daur hidup *Artemia salina* memerlukan waktu sekitar 25 hari. Kecepatan daur ini dipengaruhi oleh pH, suhu dan salinitas. Suhu letal 35°C atau lebih, sedangkan suhu optimum pertumbuhan antara 23 – 30 °C. Salinitas optimum pada penetasan 35%, kemudian setelah menetas dinaikkan hingga 80%. Kisaran pH terbaik bagi pertumbuhan *Artemia salina* yaitu 8-8,5. Daur hidup *Artemia salina* memiliki rangkaian tahapan sbb:

- a. Kista atau telur *Artemia salina* berbentuk bulat berlekuk (dalam keadaan kering) dan bulat penuh (dalam keadaan basah), berwarna coklat, diameternya 200 – 300 µm, beratnya 1,6 – 2,22 µg. Untuk menetas telur, digunakan air laut buatan dengan salinitas antara 7 – 70 %, setelah 24 – 48 jam cangkang pecah, timbul embrio masih dibungkus selaput. Telur dapat disimpan selama bertahun-tahun ditempat kering dan anaerob.
- b. Nauplius terbentuk setelah selaput pecah, panjang nauplius antara 450-475 µm, berwarna kuning kecoklatan karena mengandung kuning telur (*yolk egg*), nauplius dapat berenang bebas.
- c. Bentuk dewasa waktunya berkisar antara 7 – 15 hari (tergantung pada lingkungan). *Artemia salina* dewasa mempunyai mata mejemuk bertangkai antenulae dan alat cerna yang memanjang serta sebelas pasang thoracopoda. Makanannya adalah fitoplankton, bakteri (dalam) dan dedak halus atau tepung kedele, tepung ikan (dilaboratorium)

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Tujuan Penelitian :

1. Melakukan isolasi dan identifikasi senyawa triterpen dari kulit batang mahoni (*Swietenia mahagoni* L (Jacq)) .
2. Melakukan uji aktivitas sitotoksik senyawa triterpen dari kulit batang mahoni (*Swietenia mahagoni* L (Jacq)) dengan metode Brine Shrimp Lethality Test.

Manfaat Penelitian

1. Diperolehnya landasan ilmiah tentang penggunaan obat tradisional dari kulit batang mahoni khususnya sebagai obat anti kanker , sehingga akan memperkaya penggunaan kulit batang mahoni sebagai obat tradisional.
2. Sebagai upaya penggalian potensi bahan alam Indonesia dengan mengetahui aktivitas biologi senyawa kimia yang terisolasi, khususnya aktivitas sitotoksik dengan bioindikator *Artemia salina* .

BAB IV

METODE PENELITIAN

1. Bahan-bahan yang digunakan.

Petroleum eter

n-Heksana

Etil asetat

Metanol

Kloroform

• Silika gel 7731

Plate Silika Gel GF 254

Kulit Batang Mahoni

2. Alat-alat yang dipakai :

Fisher Melting Point

Evaporatour Vakum

Spektrometer UV-VIS merk HITACHI

Spektrometer FTIR merk Jasco

Spektrometer Massa merk Jeol

Spektrometer Resonansi Magnit Inti merk Varian 400 MHz

3. Tahapan Penelitian

3.1. Persiapan dan perlakuan bahan

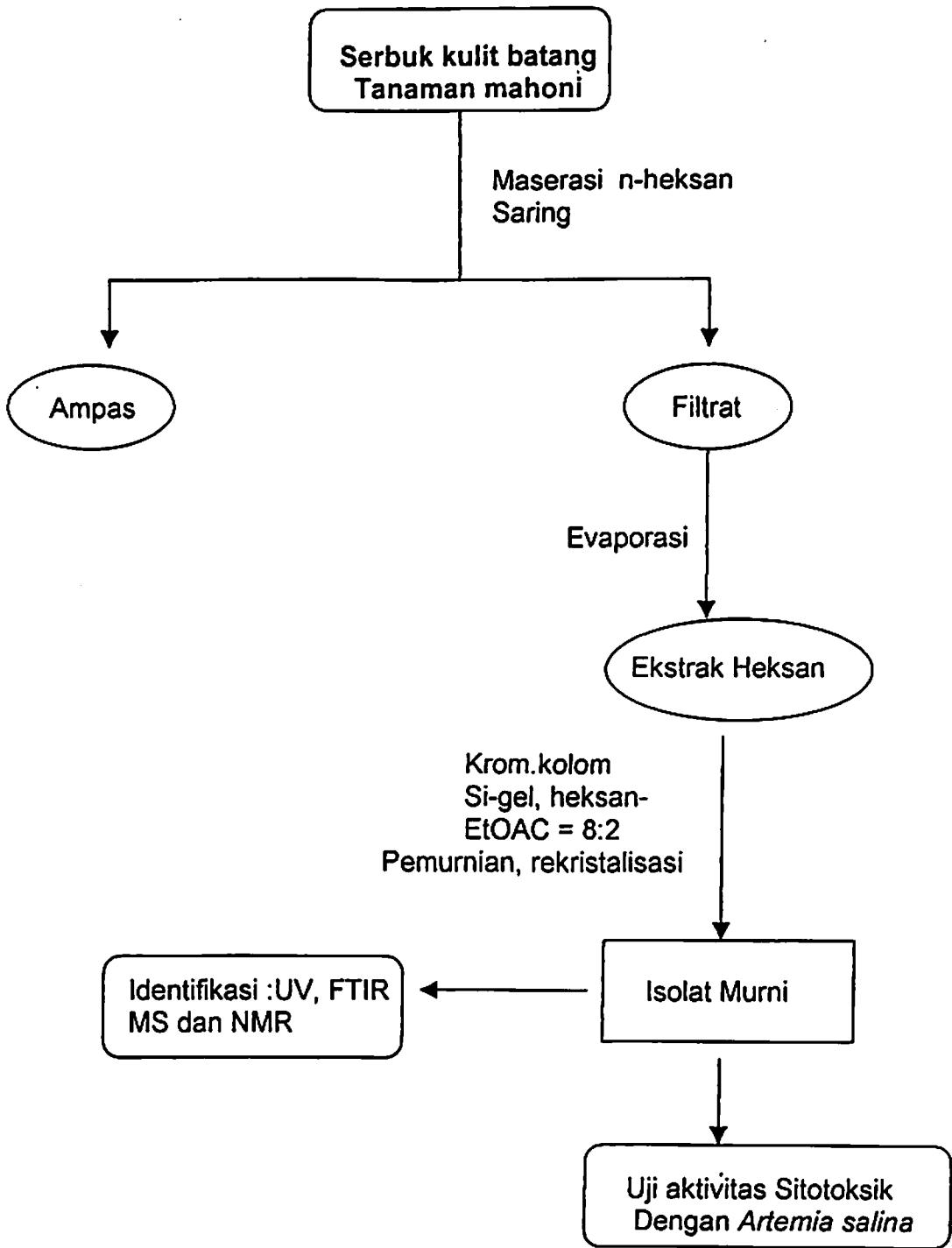
Bahan kulit batang tanaman mahoni diperoleh dari daerah Kediri pada bulan April 1998. Bahan dipotong kecil-kecil dan dikeringkan, setelah kering bahan tersebut digiling secara mekanis agar diperoleh serbuk kulit batang mahoni.

3.2. Proses Ekstraksi dan isolasi

Proses ekstraksi dilakukan terhadap 400 gram serbuk kulit batang mahoni dengan cara maserasi dengan heksan. Waktu perendaman heksan selama 24 jam dengan sekali-kali diaduk. Kemudian disaring dengan corong Buchner, dan ampas serbuk dimaserasi lagi sebanyak tiga kali dengan pelarut heksan yang baru.

Ekstrak heksan cair yang diperoleh dikumpulkan dan kemudian diuapkan dengan menggunakan vacuum evaporator, sehingga diperoleh ekstrak kental.

Terhadap ekstrak heksan dilakukan isolasi triterpen dengan menggunakan kolom kromatografi dengan fase diam silika gel 7731 dan fase gerak heksan-etil asetat = 8 : 2. Untuk lebih jelasnya skema ekstraksi dan isolasi dapat dilihat pada skema berikut.



Gambar 1. Skema rancangan penelitian

3.3. Identifikasi isolat

Terhadap isolat yang diperoleh dilakukan uji kemurnian dengan menggunakan KLT dengan fase diam silika gel GF 254 dan tiga macam eluen , heksan : etil aasetat = 8 : 2 ; kloroform : metanol = 8 :2 ; kloroform : etil aasetat = 7 : 3 , menggunakan penampak noda anisaldehyd asam sulfat.

Titik lebur ditentukan dengan Fisher Melting Point. Untuk menentukan struktur molekul isolat dianalisis dengan menggunakan spektroskopi UV, FTIR, MS dan NMR.

3.4. Uji Aktivitas Sitotoksik dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test.

Pertama disiapkan air laut yang jernih, dapat dibuat dari 38 gram garam laut yang dilarutkan dalam satu liter air kemudian disaring. Air laut dimasukkan kedalam wadah kecil yang sudah dibagi dua bagian ruangan menggunakan sekat yang sudah diberi lubang-lubang kecil. Sedikit telur udang laut *Artemia salina* kedalam salah satu ruang , kemudian ruangan satu ditutup dan bagian ruangan yang lain terbuka atau diberi lampu untuk menarik larva udang udang yang sudah menetas, sehingga larva udang terpisah dari kulit telur . Setelah 2 hari inkubasi telur udang akan menetas menjadi lalva udang yang disebut naupli, yang siap digunakan untuk penelitian.

Bahan diujikan pada konsentrasi 10, 50 , 100 , 200 , 250 µg/ml dengan replikasi tiga kali, dengan menggunakan botol vial volume 10 ml. Dan disiapkan satu botol kosong untuk kontrol. Pada masing-masing botol tersebut ditambahkan air laut 5 ml dan 10 ekor larva udang. Setelah 24 jam waktu

inkubasi, jumlah anak udang yang mati untuk tiap-tiap konsentrasi dihitung dan dicatat. Kemudian data tersebut dianalisis dengan menggunakan Finney Computer Program untuk menentukan harga LD_{50} (besarnya konsentrasi yang dapat mematikan 50% hewan coba) (Mc.Laughlin, 1991; Fansworth, 1966; Meyer, 1982).

Menurut Mc.Laughlin dan Meyer suatu ekstrak tanaman dianggap memiliki aktivitas sitotoksik apabila harga LD_{50} kurang dari 1000 $\mu\text{g/ml}$ sedangkan untuk isolat murni adalah harga LD_{50} kurang dari 100 $\mu\text{g/ml}$.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Hasil Ekstraksi dan Isolasi Triterpen

Penggunaan ekstrak heksan dalam isolasi triterpen didasarkan pada hasil penelitian Saudah, 1998 yang menyatakan bahwa ekstrak heksan kulit batang mahoni memiliki aktivitas sitotoksik dengan metode Brine Shrimp Lethality Test. Dan ternyata hasil skrining fitokimia menunjukkan adanya kandungan triterpen dalam ekstrak heksan tersebut.

Dari 400 gram serbuk kulit batang mahoni diperoleh 3 gram ekstrak kering berwarna coklat kehitaman. Hasil isolasi dan pemisahan senyawa triterpen dengan menggunakan kolom kromatografi dengan fase diam silika gel dan eluen heksan : etil asetat = 8 : 2, dengan tampungan tiap fraksi 5 ml akhirnya diperoleh 98 fraksi. Terhadap fraksi-fraksi tersebut dilakukan uji KLT dengan fase diam silika gel dan eluen heksan : etil asetat = 8 : 2, untuk fraksi yang memiliki harga R_f dan warna noda yang sama dikumpulkan dan diuapkan. Dari campuran fraksi No : 28 – 43 setelah dibiarkan semalam ternyata diperoleh kristal jarum putih agak kehitam-hitaman.

Kristal yang diperoleh dilakukan pemurnian dengan petroleum eter sehingga pengotor dan lemak yang ada dapat dihilangkan, serta selanjutnya kristal tersebut direkristalisasi dengan heksan - metanol. Dan akhirnya didapat kristal putih bentuk jarum seberat 45 mg.

2. Identifikasi Isolat Triterpen.

2.1 Dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT)

Identifikasi kualitatif serta kemurnian isolat triterpen dari kulit batang mahoni (*Swietenia mahagoni* L (Jacq)) dilakukan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan menggunakan beberapa fase gerak yang berbeda dan penampak noda anisaldehyd asam sulfat, hasilnya dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil Kromatografi Lapis Tipis Isolat Triterpen

Fase Gerak	Harga Rf	Warna noda
Heksa : Etil Asetat (8 : 2)	0,55	Ungu kemerahan
Kloroform : Metanol (8 : 2)	0,87	Ungu kemerahan
Kloroform : Etil Asetat (7 : 3)	0,75	Ungu kemerahan

Dari hasil KLT tersebut diatas terlihat bahwa dengan tiga eluen yang berbeda menunjukkan satu noda berwarna ungu kemerahan, sehingga isolat hasil isolasi dari kulit batang mahoni tersebut dapat dikatakan murni secara KLT.

2.2. Penentuan Titik Lebur Isolat Triterpen

Titik lebur isolat triterpen ditentukan dengan Fisher Melting Point dan hasilnya adalah sebagai berikut :

I . Titik lebur : 120 – 125°C

II. Titik lebur : 121 – 127°C

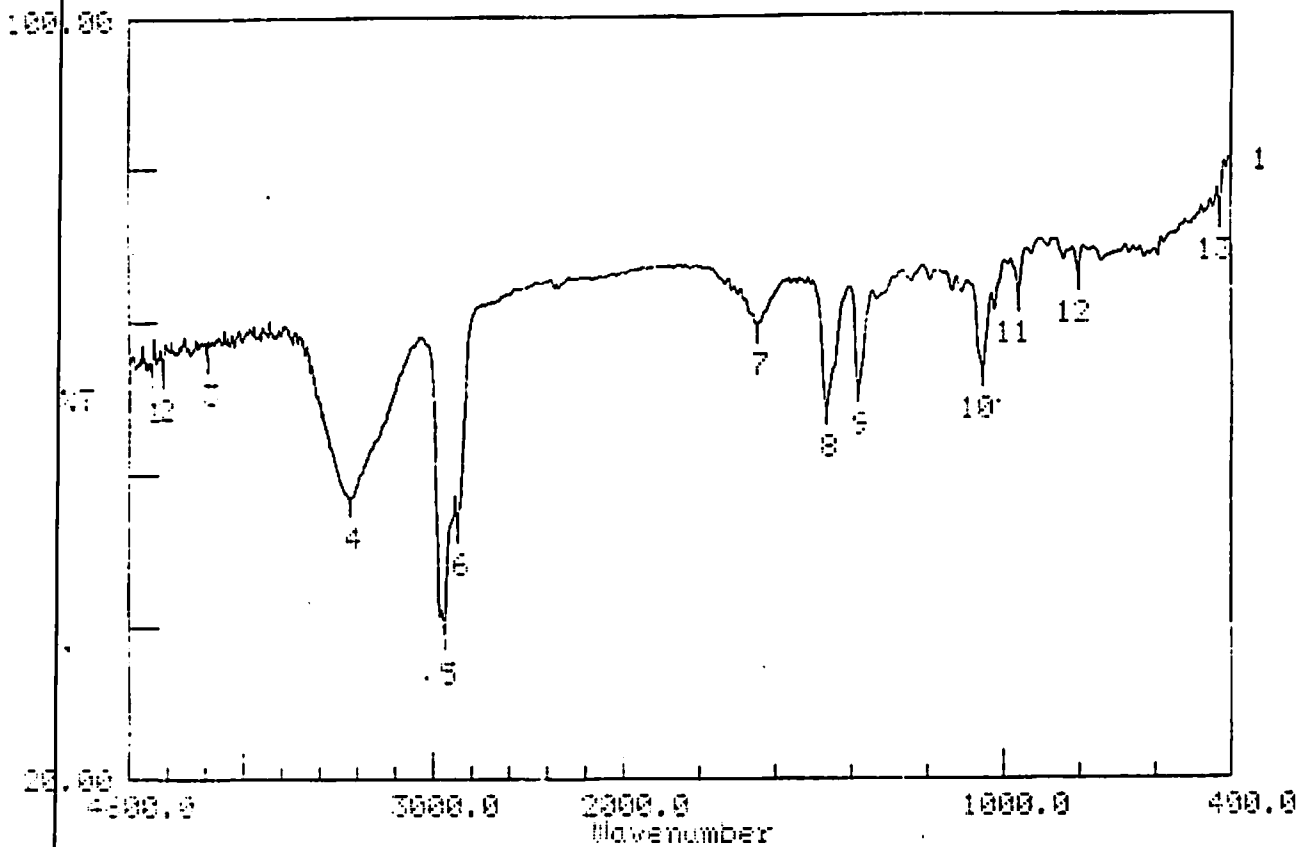
Sehingga dapat ditentukan titik lebur isolat rata-rata adalah : 120,5 – 126,5°C.

2.3. Identifikasi Isolat Triterpen dengan spektrofotometer UV, FTIR, NMR dan MS.

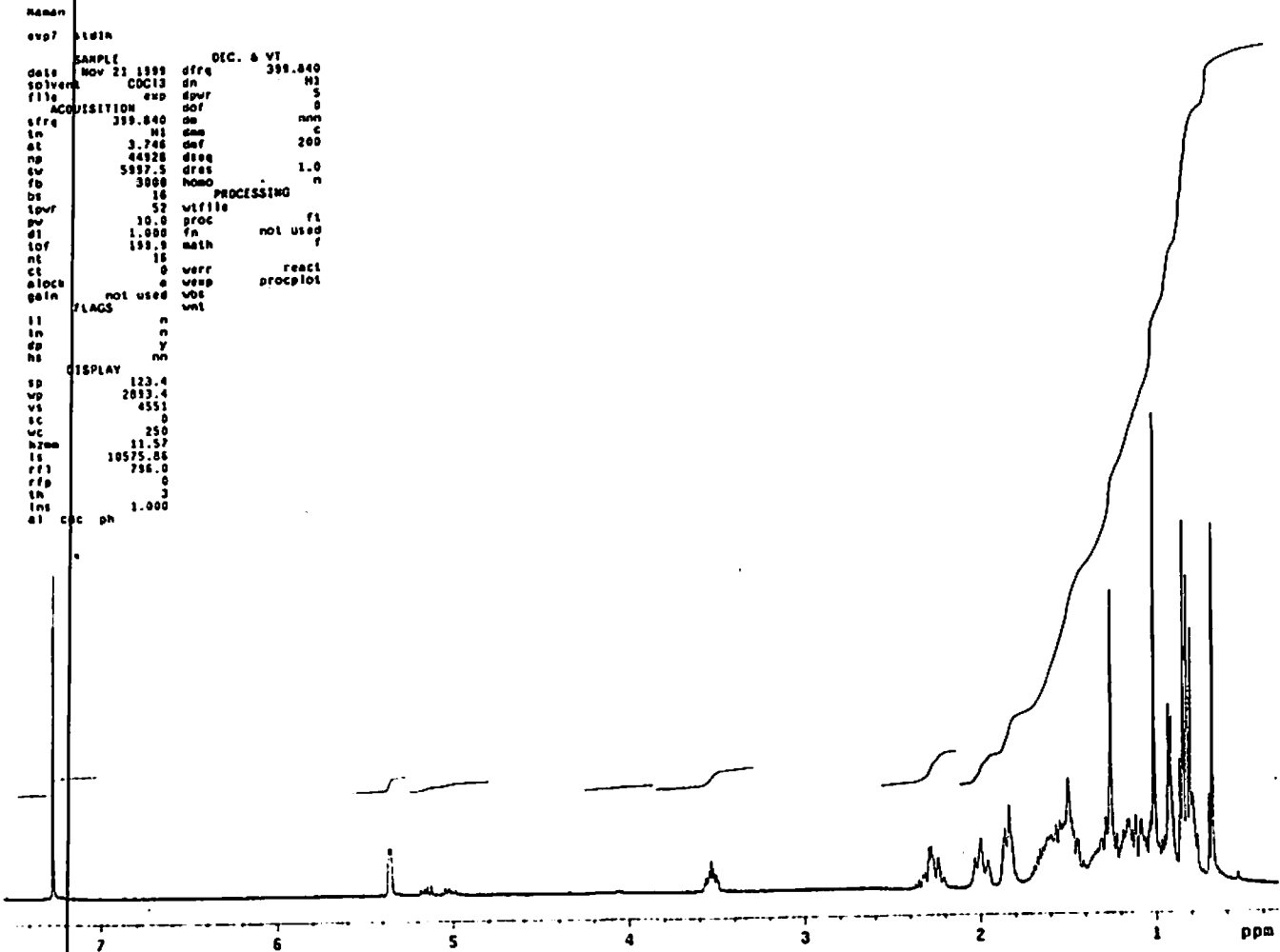
Hasil analisis dengan spektroskopi UV senyawa triterpen menunjukkan adanya satu puncak serapan maksimum pada panjang gelombang 212 nm. Hal ini menunjukkan tidak adanya ikatan rangkap terkonjugasi, namun serapan pada panjang gelombang 212 nm adalah jenis transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ yang memberikan keterangan tentang adanya ikatan rangkap karbon- karbon (Fleming, 1980).

Hasil analisis dengan spektroskopi IR senyawa triterpen menunjukkan adanya serapan-serapan pada daerah-daerah dengan bilangan gelombang dalam berturut-turut : 3433, 2937, 1645, 1464, 1381, 1053 cm^{-1} . Pita lemah (lebar) pada 3433 cm^{-1} menunjukkan adanya vibrasi ulur dari gugus –OH. Pita kuat pada 2937 cm^{-1} menunjukkan adanya vibrasi ulur C-H dari gugus –CH₃, pita

lemah pada 1645 cm^{-1} menunjukkan adanya vibrasi ulur dari gugus -C=C- . Pita kuat pada daerah 1464 cm^{-1} dan 1381 cm^{-1} menunjukkan adanya vibrasi tekuk C-H dari gugus -CH_2 dan pita lemah pada 1053 cm^{-1} karena adanya vibrasi tekuk dari -C-O (Silverstein, 1981). Data dan spektrum FTIR dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Spektrum FTIR dari senyawa triterpen



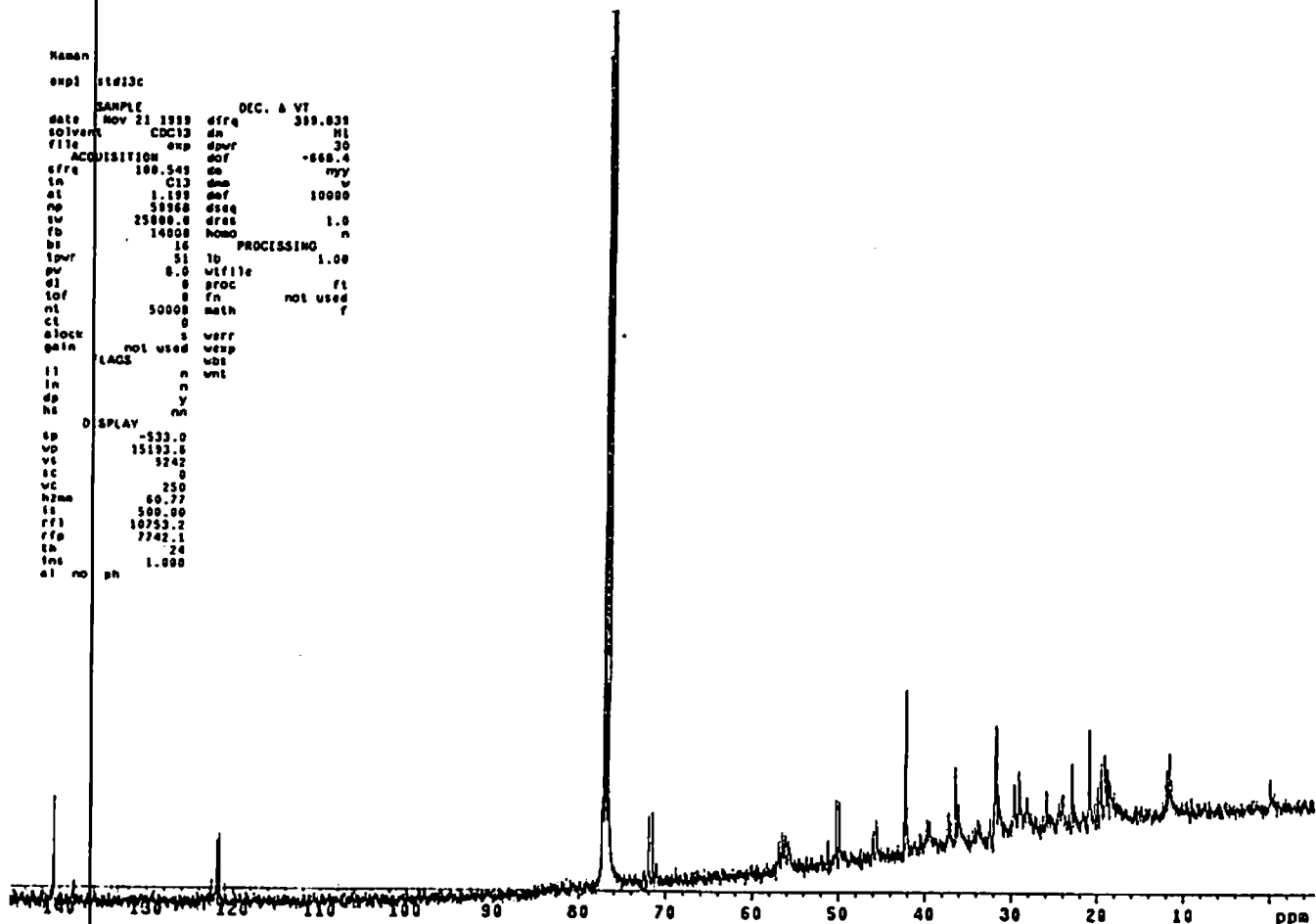
Gambar 3. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ dari senyawa triterpen

Hasil analisis dengan spektroskopi resonansi magnet inti proton ($^1\text{H-NMR}$) senyawa triterpen yang dilarutkan dengan pelarut CDCl_3 menunjukkan adanya 6 puncak-puncak tajam pada daerah-daerah dengan pergeseran kimia pada delta (dalam ppm): 0,68 (s, 3H) ; 0,80 (s, 3H) ; 0,82 (s,3H) ; 0,84 (s, 3H) ; 1,01 (s,3H) ; 1,25 (s,3H) yang menunjukkan adanya gugus metil (Rahman, 1982). Adanya gugus metil pada hasil $^1\text{H-NMR}$ ini sesuai dengan hasil pada spektrum FTIR,

adanya vibrasi C-H dari CH₃ pada bilangan gelombang 2937 cm⁻¹. Dan adanya pergeseran kimia pada delta 0,34 dan 0,56 ppm menunjukkan adanya cincin siklopropan (Kitajima,1998 ; Yingli, 1987).

Pada pergeseran kimia 5,36 dan 5,34 ppm menunjukkan dua proton terminal yang terikat pada ikatan rangkap sehingga terletak pada daerah paling "down field". Hal ini didukung oleh hasil analisis spektroskopi UV dengan adanya satu puncak serapan maksimum pada panjang gelombang 212 nm adalah jenis transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ yang memberikan keterangan tentang adanya ikatan rangkap karbon-karbon, dan sesuai juga dengan hasil spektroskopi FTIR adanya serapan pita kuat pada 1645 cm⁻¹ menunjukkan adanya vibrasi ulur dari gugus -C=C-. Satu proton signal δ 3,53 ppm (multiplet, m) menunjukkan adanya proton metina (C₃) dari -OH sekunder. Data spektum dapat dilihat pada gambar 3.

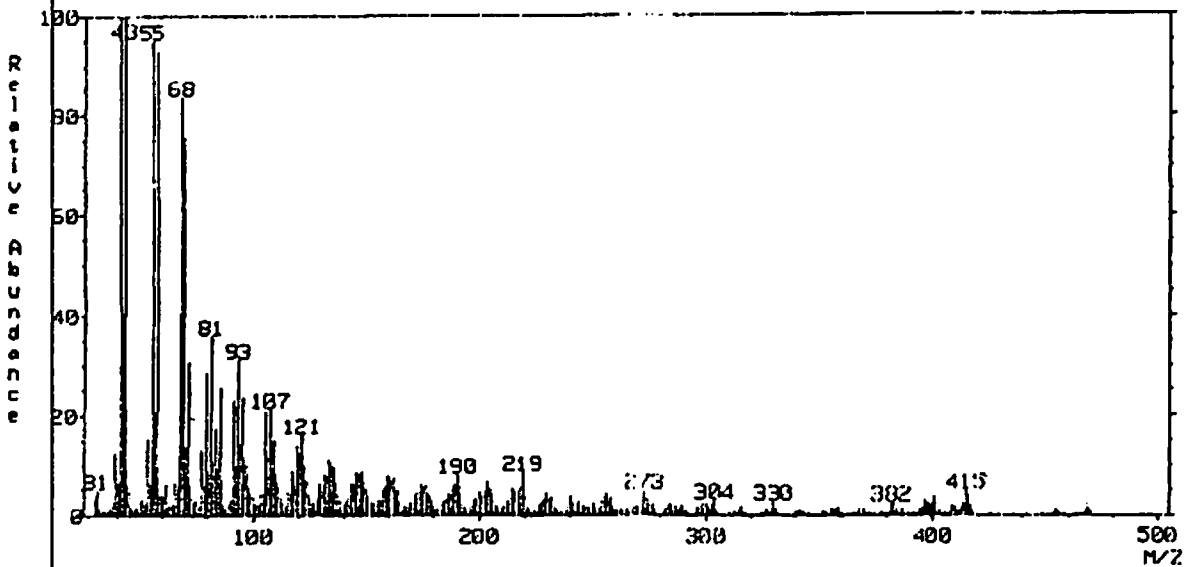
Hasil analisis dengan spektroskopi resonansi magnetik inti karbon ¹³C-NMR senyawa triterpen yang digunakan pelarut CDCl₃ menunjukkan adanya pergeseran kimia pada kimia pada δ 140,75 ppm menunjukkan adanya karbon tak jenuh sehingga terletak pada daerah paling "down field" dan δ 121,60 ppm menunjukkan adanya terminal metilen, sedangkan pada δ (setelah diekspansi) : 71,60 ; 56,94 ; 56,56 ; 56,17 ; 55,84 ; 50,24 ; 49,90 ; 45,98 ; 45,60 ; 42,45 ; 42,26 ; 42,26 ; 36,47 ; 31,98 ; 31,82 ; 31,35 ; 29,69 ; 29,14 ; 25,97 ; 23,01 ; 21,05 ; 19,983 ; 19,66 ; 19,20 ; 18,93 ; 18,88 ; 11,98 ; 11,69 ppm adalah menunjukkan adanya alkana : -CH, CH₂ dan -CH₃ (Kemp,1986). Pergeseran kimia pada delta 29,69 dan 25,97 ppm menunjukkan karbon pada cincin siklopropan (Kitajima,1998 ; Yingli, 1987. Data spektum dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. Spektrum C-NMR dari senyawa triterpen

Analisis dengan spektrum massa diperoleh puncak ion molekul yang kurang jelas. Namun dari hasil fragmentasi yang dihasilkan ditunjukkan adanya puncak spektrum pada massa m/z : 382, 330, 304, 273, 219, 190, 121, 107, 93, 81, 68, 55, 43, 31 dan sebagai puncak dasar adalah m/z 43. Dilihat dari pola fragmentasi massanya merupakan ciri fragmentasi dari senyawa triterpen (Wahyuono, 1990). Data spektrum massa dapat dilihat pada gambar 5.

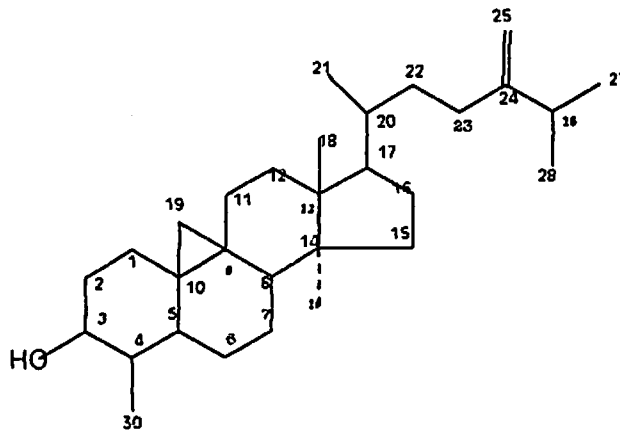
MASS SPECTRUM Data File: FFMAPAN 0-DEC-99 11:14
 Sample: TRITERPEN ?
 RT 2.39 EI (Pos.) GC 1.4c BP: m/z 41.1174 Int. 26.1916 Lv 0.00
 Scan# (50 to 270)



Gambar 5. Spektrum massa dari senyawa triterpen

Berdasarkan pengamatan spektroskopi : UV, FTIR, ^1H - ^{13}C NMR dan MS serta dibandingkan profil spektrum dari beberapa hasil isolat triterpen tipe sikloartan dari seperti : 31-norsikloartan dari *Costus speciosus* Fam. Zingiberaceae (Gupta, 1987) ; asetoksisikloartanol dari *Ficus pumila* Fam. Moraceae (Kitajima, 1998) ; siklolanostan dari *Astragalus membranaceus* Fam.

Leguminosae (Yingli, 1997) dan disebutkan juga oleh Hegnauer;1966 salah satu kandungan kimia dari mahoni adalah sikloartanol. Maka senyawa hasil isolasi dari kulit batang mahoni dapat diduga sebagai triterpen tipe sikloartan yaitu 4 β -demetil-24-metilen sikloartanol, dengan kemungkinan rumus struktur sebagai berikut :



Gambar 6. Struktur kimia 4 β -demetil-24-metilen sikloartanol

Dari hasil isolasi dan hasil identifikasi isolat dari kulit batang mahoni diduga sebagai senyawa triterpen tipe sikloartan , hal ini berbeda dengan kandungan senyawa triterpen yang terdapat biji mahoni yang mengandung triterpen tipe tetranortriterpenoid (Kadota, 1990).

3. Uji Sitotoksik Senyawa Triterpen dengan metode Brine Shrimp Lethality Test (BST).

Dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* yang telah ditetaskan 48 jam, ditambahkan senyawa triterpen dengan konsentrasi: 10, 50, 100, 200 dan 250 $\mu\text{g/ml}$ dinkubasi lagi selama 24 jam, dan hasil aktivitas sitotoksiknya ditunjukkan pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil pengamatan aktivitas sitotoksik senyawa triterpen terhadap bioindikator *Artemia salina*

No	Konsentrasi Triterpen ($\mu\text{g/ml}$)	Jumlah larva udang yang duji	Jumlah larva udang yang mati	Jumlah larva udang yang mati pada kelompok kontrol negatif
1	10	30	16	0
2	50	30	20	0
3	100	30	18	0
4	200	30	20	0
5	250	30	21	0

Dari hasil pengamatan aktivitas sitotoksik senyawa triterpen terhadap *Artemia salina* kemudian dilakukan analisis statistik untuk penentuan harga LD_{50} dengan *Finney Computer Program* dan hasilnya dapat dilihat pada tabel analisis dibawah ini.



FINNEY PROBIT ANALYSIS FOR QUANTAL DATA
CALCULATED ED50, LD50 ECT

DATA REQUIRED FOR EACH DOSES

- N - THE NUMBER OF SHRIMP AT DOSE LEVELS
- P - THE NUMBER OF SHRIMP KILLED
- D - THE ARITHMETRIC DOSE

ENTER NUMBER OF DOSE LEVELS USED ? 5
ENTER DATA

N	P	D
>30	>16	>10
>30	>20	>50
>30	>18	>100
>30	>20	>200
>30	>21	>250

DO YOU WANT TO PRINT THE CALCULATED VALUES (Y/N) Y

*****RECYCLE*****

EXPECTED PROBIT

CALCULATED PROBIT

5.108	5.112
5.289	5.296
5.367	5.375
5.445	5.454
5.470	5.479

CHI SQUARE FOR 4 DEGREE(S) OF FREEDOM = 0.6586

ED50 = 3.7302

G = 2.3761

UPPER CONFIDENCE LIMIT = 33.0355

LOWER CONFIDENCE LIMIT = %12387.4000

DO YOU WANT TO ENTER A NEW DATA SET (Y/N) N

Dari hasil perhitungan harga LD_{50} senyawa triterpen dari kulit batang mahoni tersebut memiliki aktivitas sitotoksik, dimana harga LD_{50} nya adalah sebesar 3,7302 $\mu\text{g/ml}$, hal ini sesuai dengan yang dinyatakan oleh Mc.Laughlin dimana isolat murni dari tanaman dikatakan aktif terhadap metode *Brine Shrimp Lethality Test* jika harga LD_{50} kurang dari 100 $\mu\text{g/ml}$.

Sehingga penelitian terhadap senyawa triterpen dari kulit batang mahoni dapat dilanjutkan dengan menggunakan metode yang lebih spesifik dengan menggunakan sel kanker, seperti : sel line atau kultur sel kanker manusia secara *in vitro* dan dengan hewan mencit yang menderita kanker secara *in vivo*. Sehingga isolat triterpen tersebut dapat dibuktikan kemampuan sitotoksiknya terhadap sel line dan sel kanker manusia, dan pada akhirnya isolat triterpen tersebut dapat dikembangkan sebagai bahan obat antikanker.

Senyawa triterpen tipe sikloartan yang memiliki aktivitas antikanker adalah 9,9-sikloart-25-ene-3,24-diol dari tanaman *Euphorbia pulcherima* Familia Euphorbiaceae. Triterpen tersebut cukup aktif terhadap kultur sel Ehrlich ascites dengan menunjukkan harga LD_{50} 7,5 μM (Kielland, 1996).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pengolahan data yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Dari kulit batang mahoni (*Swietenia mahagoni* L (Jacq)) dapat diisolasi senyawa triterpen tipe sikloartan.
2. Senyawa triterpen dari kulit batang mahoni (*Swietenia mahagoni* L (Jacq)) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap bioindikator *Artemia salina* dengan harga LD₅₀ sebesar 3;7302 µg/ml.

SARAN

1. Perlu dilakukan identifikasi isolat triterpen dari kulit batang mahoni dengan spektroskopi massa dan X – Ray untuk memastikan struktur kimianya.
2. Perlu dilakukan uji sitotoksik terhadap senyawa triterpen dari kulit batang mahoni (*Swietenia mahagoni* L (Jacq)) dengan menggunakan metode uji sitotoksik lain, misalnya dengan kultur sel kanker hewan maupun manusia .

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, J.E., Goetz, C.M., and McLaughlin, J.L., 1991. A Blind Comparison of Simple Bench-top Bioassays and Human Tumor Cell Cytotoxicities as Antitumor Prescreens, *Phytochem. Anal.* Vol. 2, hal. 107-111.
- Backer, C.A., and Bakhuizen van der Brin, B.C., 1965, *Flora of Java*, Vol. II, Groningen, The Netherlands : N.V.P. Noordhoff.
- Ekimoto, H. et al. 1991. Platelet Aggregation Inhibitors From The Seed of *Swietenia mahagoni* : Inhibition In Vivo of In Vitro Platelet Activating Factor Induced Effect of Tetrano-triterpenoids Related to Swietenine and Swietenolide, *Planta Medica*, Vol. 57, No. 1, February, hal. 56-58.
- Fleming, I., Williams, D.H., 1980. *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*, 3rd ed., Mc.Graw-Hill Book Comp., England.
- Franworth, N.R. 1966. Biological and Phytochemical Screening of Plant, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55, hal. 225-236.
- Fuad, C. dan Dulay, T., 1985. *Artemia salina*, Jaringan Informasi Perikanan Indonesia, Dirjen Perikanan, No. 12.

Gupta, M.M., Singh, S.B., Shukla Y.N., 1987. Investigation of Costus : V. Triterpen of *Costus speciosus* Roots, *Plantaa Medica*, hal.268.

Heyne, K., 1987, *Tumbuhan Berguna Indonesia*, Jilid III, Yayasan Satya Wana Jaya, Jakarta.

Hegnauer, 1966. *Chemotaxonomic der Pflanzen.*, Band III. hal. 67 – 69.

Kitajima, J., Kaoru, K., Yasuko Tanaka, 1998. New Sterol and Triterpenoids of *Ficus pumila* Fruit, *Chem. Pharm.Bull.* 46 (9) hal. 1408-1411.

Kadota, S., Lamek, M., Tohr K., Hisao E., 1990. Constituents of the Seeds of *Swietenia mahagoni* Jacq. II. Structures of Swietemahonin A, B, C, D, E, F and G and Swietemaholide, *Chem. Pharm. Bull.* 38 (4), hal. 894 – 901.

Kielland, I.S. et.al. 1996. Cytotoxic Triterpenoid from the Leaves of *Euphorbia pulcherrima*, *Planta Medica*, 62, hal : 322-325.

McLaughlin, J.L. 1991. Crown Gall Tumours on Potato Disc and Brine Shrimp Lethality : Two Simple Bioassay for Higher Plant Screening and Fractination, In: K Hostettman (Ed), *Method in Plant Biochemistry*, Academic Pres, hal. 6, 1-32.

Meyer. 1982. Brine Shrimp : Convient General Bioassay for Active Constituens, *Planta Medica*, 45, hal.31-34.

Nafrialdi dan Gan, S., 1995, Antikanker, Farmakologi dan Terapi, editor Sulistia Gan, Ganiswara, Gaya Baru, hal. 686-701.

Kemp,W., 1986. *NMR in Chemistry*, MacMillan, hal 84 –93 dan 211 – 223.

Rahman, A.U. 1982. *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, Vol I, Press manager UGC Print-shop, Pakistan.

Syamsuhidayat, S.S., Hutapea, J.R., 1991, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*, Jilid I, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.

Silverstein, Bassler and Morrill, 1981, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 4th Ed, John Wiley and Sons Singapore.

Steenis, C.G.G.J., Van, 1981, *Flora Untuk Sekolah di Indonesia*, P.T. Pradnya Paramita, Jakarta, Hal. 417.

Wahyuono,S. 1990. Identifikasi Dua triterpen Asaam yang terdaapat didalam *Amssonia grandiflora* Fam. Apocynaceae. *Majalah Farmasi Indonesia*, Vol. 4. No.2. hal 44 – 54.

Yingli, MA , et.al. 1997. Studies of Constituents of *Astragalus membranueces* .
II. Structures of Triterpenenoidal Glycosides, Huangqiyenins A and B, from
Leaves. Chem.Pharm.Bull. 45 (2) 359 – 361.