

## Profil Metabolit Sekunder Ekstrak Daun Berenuk (*Crescentia Cujete L.*) Dan Uji Sitotoksik Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test

Afdhil Arel, Epi Supri Wardi\*, Yolanda Oktaviani

Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia Yayasan Perintis Padang

### Detail Artikel

Diterima Redaksi : 23 Februari 2018  
Direvisi : 25 April 2018  
Diterbitkan : 30 Oktober 2018

### Kata Kunci

*Crescentia kujete*; Brine shrimp;  
*Artemia salina*

### Penulis Korespondensi

Epi Supri Wardi  
[epi.supriwardi@gmail.com](mailto:epi.supriwardi@gmail.com)

### ABSTRAK

Tanaman berenuk (*Crescentia kujete L.*) merupakan salah satu tanaman yang tumbuh di Indonesia. Secara tradisional daun berenuk digunakan untuk mengobati luka baru dan menurunkan hipertensi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui profil metabolit sekunder ekstrak daun berenuk dan uji sitotoksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dengan metode brine shrimp lethality test. Uji skrining fitokimia menunjukkan ekstrak daun berenuk mengandung alkaloid, flavonoid, fenolik dan steroid. Dari hasil identifikasi dengan metode KLT terhadap ekstrak daun berenuk diduga adanya alkaloid dengan nilai Rf 0,82; flavonoid dengan nilai Rf 0,57; fenolik dengan nilai Rf 0,85 dan steroid dengan nilai Rf 0,55. Hasil identifikasi dengan spektrofotometer uv-visible diperoleh empat puncak dengan panjang gelombang 664 nm, 402 nm, 329 nm dan 213 nm. Hasil uji sitotoksik didapatkan nilai LC50 30,54 µg/ml yang berarti ekstrak daun berenuk aktif terhadap "brine shrimps" dengan level toksisitas yaitu toksik.

### PENDAHULUAN

*Crescentia kujete* (dalam bahasa Inggris "Calabas", Prancis "Calabassier") adalah tanaman yang tumbuh pada daerah tropis dan merupakan tanaman asli negara Amerika Tengah, Kamerun serta beberapa negara bagian Afrika. Di beberapa tempat di Jawa Tengah dan Jawa Timur, tanaman ini dikenal juga sebagai berenuk dan maja. Secara tradisional tanaman ini banyak digunakan sebagai obat diare, anti-radang dan obat luka. Tanaman ini memiliki beberapa kandungan kimia yang penting antara lain flavonoid-quercetin, tannin, fenol, saponin, anthraquinon dan cardenolides (Kusuma, Susanti, & Akbariani, 2014).

Hasil penelitian terbaru yang dilakukan di Fakultas Farmasi UMP (Universitas Muhammadiyah Purwokerto) juga menunjukkan bahwa Ekstrak etanol daun Berenuk dengan konsentrasi 60% dan 80 % secara signifikan mampu mempercepat penghentian pendarahan luar mencit (Kusuma *et al*, 2012) serta mempunyai aktivitas antiradang (antiinflamasi) pada mencit secara in vivo dengan dosis 1680, 3360 dan 6720 mg/kg BB (Kusuma *et al*, 2013).

Daun berenuk dalam pengobatan tradisional di Jawa digunakan untuk mengobati luka baru dan menurunkan hipertensi. Daun mudanya ditumbuk dan dijadikan pengkompres untuk sakit kepala dan membersihkan luka baru. Sementara daging buahnya digunakan untuk mengobati diare, flu, bronkhitis, batuk, asma, dan uretritis (Heyne, 1987).

Sitotoksik merupakan kemampuan suatu senyawa yang potensial menginduksi kematian sel, mekanisme yang diharapkan dari kematian sel tersebut adalah kematian terprogram atau

apoptosis. Uji sitotoksik dilakukan untuk melihat potensi suatu obat antikanker atau suatu metode terstandarisasi untuk menentukan apakah suatu material mengandung bahan yang berbahaya (toksik) secara biologis. Sistem tersebut merupakan uji kualitatif dengan menetapkan kematian sel (Anggraini, 2008). Parameter dari uji sitotoksik adalah nilai  $LC_{50}$  yaitu yang nilai menunjukkan konsentrasi hambatan proliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Semakin besar nilai  $LC_{50}$  maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Amalina, 2008).

Penggunaan daun berenuk secara oral oleh masyarakat untuk menurunkan hipertensi belum mengetahui konsentrasi yang dapat menyebabkan toksik, sehingga dengan dilakukan penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai kandungan kimia dan sitotoksik. Dengan penelitian lebih lanjut, senyawa sitotoksik ini bisa dikembangkan menjadi senyawa anti bakteri, anti jamur, germisida, anti kanker dan sebagainya. Berdasarkan uraian di atas penulis tertarik untuk melakukan penelitian mengenai Profil Metabolit Sekunder Ekstrak Daun Berenuk (*Crescentia kujete L.*) Dan Uji Sitotoksik Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test.

## METODE PENELITIAN

### Ekstraksi Sampel Daun Berenuk (*Crescentia kujete L.*)

Daun berenuk sebanyak 1 kg dibersihkan dari ranting dan pengotor dengan dicuci dengan air lalu dipotong kecil dan keringkan, kemudian sampel dimaserasi dengan cara sampel dimasukkan kedalam botol berwarna gelap direndam dengan pelarut etanol 70 % selama 3 hari sambil sesekali di aduk. Setelah 3 hari perendaman, disaring dengan kertas saring untuk mendapat maseratnya, ampasnya dimaserasi lagi dengan etanol 96%. Gabungkan maserat, lalu maseratnya diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental (Departemen Kesehatan RI, 2011).

### Evaluasi Ekstrak Daun Berenuk (Departemen Kesehatan RI, 2011)

#### a. Pemeriksaan Organoleptis

Pengamatan dilakukan secara visual dengan mengamati bentuk, warna dan bau.

#### b. Penentuan Rendemen Ekstrak

Timbang ekstrak kemudian hasil ekstraksi yang diperoleh ditimbang kembali. Hitung rendemen dengan rumus: 
$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Berat ekstrak yang diperoleh}}{\text{Berat sampel basah}} \times 100\%$$

#### c. Pemeriksaan Susut Pengerinan

Keringkan krus porselen dan tutupnya di dalam oven pada suhu  $105^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit dan dibiarkan dingin, lalu ditimbang beratnya. Masukkan ekstrak ke dalam krus tersebut hingga beratnya 1 gram diluar berat krus dengan penutup yang telah diketahui sebelumnya. Dengan perlahan goyang krus agar ekstrak merata dan masukkan kembali ke dalam oven, buka tutupnya dan biarkan tutup tetap berada di dalam oven. Krus yang telah berisi ekstrak dipanaskan dalam oven dengan suhu  $105^{\circ}\text{C}$  selama 1 jam. Setelah itu krus dikeluarkan dan didinginkan dalam desikator, lalu ditimbang. Lakukan pengulangan seperti cara di atas hingga diperoleh berat yang konstan.

$$\% \text{ susut pengerinan} = \frac{(B-A)-(C-A)}{X 100\% (B-A)}$$

Keterangan: A= Berat krus kosong

B= Berat krus + sebelum sampel dipanaskan

C= Berat krus + setelah sampel dipanaskan

#### d. Pemeriksaan Kadar Abu

Ekstrak ditimbang sebanyak 2 gram, dimasukkan ke dalam krus yang telah dipijarkan dan ditara, kemudian diratakan. Di pijar perlahan-lahan hingga arang habis, kemudian didinginkan dalam desikator kemudian ditimbang. Setelah itu arang tersebut dimasukkan dalam furnes selama 6 jam pada suhu 600°C, sehingga terbentuk abu, dinginkan dalam desikator timbang berat abu yang diperoleh. Hitung menggunakan rumus :

$$\% \text{ Kadar Abu} = \frac{(C-A)}{(B-A)} \times 100\%$$

Keterangan :

A = Berat krus kosong

B = Berat krus + sampel  
sebelum dipijarkan

C = Berat krus + sampel setelah dipijarkan

#### Uji Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Berenuk (*Crescentia kujete L.*) (Harborne, 1987)

Ekstrak kental daun berenuk ditimbang 0,5 g kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi. Ditambahkan kloroform dan air masing – masing 5 ml (1:1) kemudian kocok kuat biarkan sejenak hingga terbentuk 2 lapisan yaitu air dan kloroform.

##### a. Lapisan Air

###### 1. Uji flavonoid (metode *Sianidin test*)

Letakkan 1–2 tetes lapisan air pada plat tetes, tambahkan sedikit serbuk logam Mg dan beberapa tetes HCl<sub>(p)</sub>, timbulnya warna kuning-oranye sampai merah menunjukkan adanya senyawa flavonoid.

###### 2. Uji fenolik

Letakkan 1-2 tetes lapisan air pada plat tetes, kemudian tambahkan 1-2 tetes pereaksi FeCl<sub>3</sub>, terbentuknya warna biru menandakan adanya kandungan fenolik.

###### 3. Uji saponin

Lapisan air dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian kocok, apabila terbentuk busa yang permanen (± 15 menit) menunjukkan adanya saponin.

##### b. Lapisan Kloroform

###### 1. Uji terpenoid dan steroid (metode *Simes*)

Lapisan kloroform disaring dengan norit, hasil saringan di pipet 2-3 tetes dan dibiarkan mengering pada plat tetes, setelah kering di tambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat (pereaksi Lieberman-Bouchard) jika terbentuk warna merah bata berarti positif terpenoid dan jika terbentuk warna biru atau hijau berarti positif steroid.

###### 2. Uji alkaloid ( metode *Culvenore–Firstgerald*)

2-3 tetes lapisan kloroform ditambahkan dengan 10 ml kloroform amoniak dan 1 tetes asam sulfat 2 N, kemudian kocok kuat dan diamkan sampai terbentuk dua lapisan ambil lapisan asam lalu tambahkan 1-2 tetes pereaksi mayer, reaksi positif alkaloid ditandai dengan adanya kabut putih hingga gumpalan putih. **Uji Kromatografi Laps Tipis (Marliana, 2007)**

Ekstrak yang diperoleh diidentifikasi zat aktifnya menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Ekstrak kental daun berenuk dilarutkan dengan etanol 96% kemudian ditotolkan pada fase diam silika gel 60 GF254 dan dielusi dengan fase gerak sebagai berikut:

###### 1. Identifikasi senyawa golongan alkaloid

Fase gerak: etil asetat-metanol-air (6:4:2), penampak noda: pereaksi dragendorff. Jika timbul warna coklat atau jingga setelah penyempotan pereaksi dargendorff menunjukkan

adanya alkaloid dalam ekstrak. Bila tanpa pereaksi kimia, dibawah lampu UV 365 nm alkaloid akan berfluoresensi biru, biru-hijau atau ungu.

2. Identifikasi senyawa golongan flavonoid

Fase gerak: butanol-asam asetat glacial-air (4:1:5) dan terdiri dari 2 lapisan. Lapisan diatas diambil dan dipakai sebagai fase gerak, penampak noda: uap amoniak. Jika timbul warna kuning atau kuning-coklat setelah pemberian uap amoniak menunjukkan adanya flavonoid dalam ekstrak. Bila tanpa pereaksi kimia dibawah lampu UV 365 nm flavonoid akan berfluoresensi biru, kuning atau hijau tergantung dari strukturnya.

3. Identifikasi senyawa golongan fenolik

Fase gerak: kloroform-etil asetat-asam formiat (0,5:9:0,5), penampak noda: pereaksi  $FeCl_3$  10%. Jika timbul warna hitam setelah penyemprotan pereaksi  $FeCl_3$  10% menunjukkan adanya senyawa fenolik dalam ekstrak. Bila tanpa pereaksi kimia dibawah lampu UV 365 nm fenolik akan berfluoresensi biru terang.

4. Identifikasi senyawa golongan terpenoid/steroid

Fase gerak: n-heksan-etil asetat (4:1), penampak noda: anisaldehyd asam sulfat. Jika timbul warna ungu-merah atau ungu setelah penyemprotan pereaksi anisaldehyd asam sulfat menunjukkan adanya terpenoid/steroid dalam ekstrak. Bila tanpa pereaksi kimia dibawah lampu UV 365 nm terpenoid/steroid akan berfluoresensi biru terang.

### Spektrofotometer UV-Visible

Ekstrak kental daun berenuk (*Crescentia kujete*) dibuat dengan konsentrasi 60 ppm, dimana 6 mg ekstrak kental dilarutkan dalam 100 ml etanol 96%. Blanko yang digunakan adalah etanol 96% murni, kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Visible.

### Penetasan larva udang *Artemia salina* Leach (Sufiana, 2014)

Wadah disekat dua bagian, diisi dengan air laut sebanyak 1L. Telur *Artemia salina* dimasukkan pada bagian sekat yang tertutup dan sekat yang satu dibiarkan terbuka, kemudian diberi lampu diatas bagian yang terbuka untuk menarik udang *Artemia salina* menuju bagian yang terkena cahaya lampu sehingga terpisah dari cangkangnya. Telur-telur dari *Artemia salina* akan menetas menjadi larva dalam waktu 48 jam dan digunakan untuk uji toksisitas.

### Pengujian Sitotoksik terhadap Ekstrak Daun Berenuk (*Crescentia kujete L.*) dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (Sufiana, 2014)

Larva udang *Artemia salina* Leach ditetaskan dalam wadah pembiakan yang berisi air laut dan digunakan 48 jam setelah pembentukan larva. Ekstrak kental yang diperoleh dari ekstrak kemudian dilakukan uji sitotoksik dengan menggunakan larva udang. Pengujian ekstrak dilakukan dengan 3 variasi konsentrasi yaitu 10  $\mu g/ml$ , 100  $\mu g/ml$  dan 1000  $\mu g/ml$ . Sebelum dibuat larutan uji terlebih dahulu dibuat larutan induk dengan cara : sebanyak 40 mg ekstrak dilarutkan dalam 4 ml etanol 96% sehingga didapatkan masing- masing kadar larutan induk 10.000 ppm. Dari larutan induk tersebut dipipet 5  $\mu l$ , 50  $\mu l$  dan 500  $\mu l$  kedalam vial, selanjutnya larutannya larutan uji dimasukkan kedalam desikator sampai pelarutnya menguap. Ekstrak yang telah kering dari masing- masing vial dilarutkan dengan 50  $\mu l$  DMSO kemudian ditambahkan air laut 3,5 ml. Masukkan larva *Artemia salina* Leach pada masing- masing vial sebanyak 10 ekor kemudian ditambahkan air laut sampai tanda batas kalibrasi (5ml). Larva udang diamati setelah 24 jam setelah perlakuan dan nilai  $LC_{50}$  dapat dihitung dengan metoda probit.

Untuk kontrol 50 µl DMSO dimasukkan kedalam vial uji kemudian ditambahkan air laut 3,5 ml. Masukkan larva *Artemia Salina* Leach 10 ekor kemudian ditambahkan lagi air laut hingga batas kalibrasi (5ml). Masing- masing dibuat dengan 3 kali pengulangan.

### Analisa Data

Dari hasil penelitian ini akan dianalisa dengan metoda probit untuk mengetahui nilai  $LC_{50}$ . (Mayer *et al*, 1982) menyebutkan tingkat sitotoksik suatu ekstrak  $LC_{50} \leq 30 \mu\text{g/ml}$ = Sangat toksik,  $LC_{50} \leq 1000 \mu\text{g/ml}$ = Toksik dan  $LC_{50} > 1.000 \mu\text{g/ml}$ = Tidak toksik.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil ekstraksi daun berenuk didapatkan sebanyak 21,4 g dengan bentuk ekstrak kental, warna hijau kehitaman dan bau khas daun berenuk. Dari hasil ekstrak tersebut didapatkan rendemen ekstrak daun berenuk yaitu 2,14%. Kemudian dilakukan pemeriksaan susut peneringan bertujuan untuk mengetahui kadar yang menguap dari suatu zat atau senyawa yang hilang pada susut pengeringan, sedangkan pada pemeriksaan kadar abu dilakukan bertujuan untuk mengetahui sisa yang tidak menguap dari suatu simplisia dari pembakaran. Pada penelitian ini hasil yang diperoleh yaitu susut penegeringan 15,08% dan kadar abu 19,97%.

Pada uji skrining fitokimia ekstrak daun berenuk dilakukan dengan penambahan reagen-reagen kimia berdasarkan golongan senyawa. Setelah dilakukan uji skrining fitokimia, ekstrak daun berenuk mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu alkaloid, flavonoid, fenolik dan steroid. Menurut penelitian yang dilakukan (Ejelonu *et al*, 2011) *Crescentia kujete* memiliki kandungan senyawa aktif yaitu saponin, flavonoid, cardenolides, tannin dan fenol. Hal ini menunjukkan bahwa suatu tanaman dimana spesies dan familisama memiliki kandungan metabolit sekunder berbeda, dikarenakan oleh faktor dari tempat tanaman tumbuh tersebut seperti unsur tanah, cuaca dan lainnya (Aristyanti, Siswoyo, & Batubara, 2014).

**Tabel 3.** Hasil Uji Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Berenuk

No	Kandungan Kimia	Reagen	Hasil	Pengamatan
1.	Flavonoid	Logam Mg+HCl	+	Orange kemerahan
2.	Fenolik	FeCl <sub>3</sub>	+	Biru
3.	Saponin	-	-	Tidak terbentuk busa
4.	Terpenoid	Pereaksi Lieberman-Bouchard	-	Hijau
5.	Steroid	Pereaksi Lieberman-Bouchard	+	Hijau
6.	Alkaloid	Pereaksi Mayer	+	Kabut putih kekuningan

Pada uji kromatografi lapis tipis, identifikasi senyawa alkaloid terhadap ekstrak daun berenuk menggunakan fase gerak etil asetat-metanol-air (6:4:2) diduga adanya senyawa alkaloid ditandai dengan berfluoresensi biru dibawah lampu uv 365 nm dengan nilai Rf 0,82. Identifikasi senyawa flavonoid terhadap ekstrak daun berenuk menggunakan fase gerak butanol- asam asetat glasial- air (4:1:5) diduga adanya senyawa flavonoid ditandai dengan berfluoresensi hijau dibawah lampu uv 365 nm dengan nilai Rf 0,57. Identifikasi senyawa fenolik terhadap ekstrak daun berenuk menggunakan fase gerak kloroform-etil asetat-asam formiat (0,5:9:0,5) diduga adanya senyawa flavonoid ditandai dengan warna hitam setelah

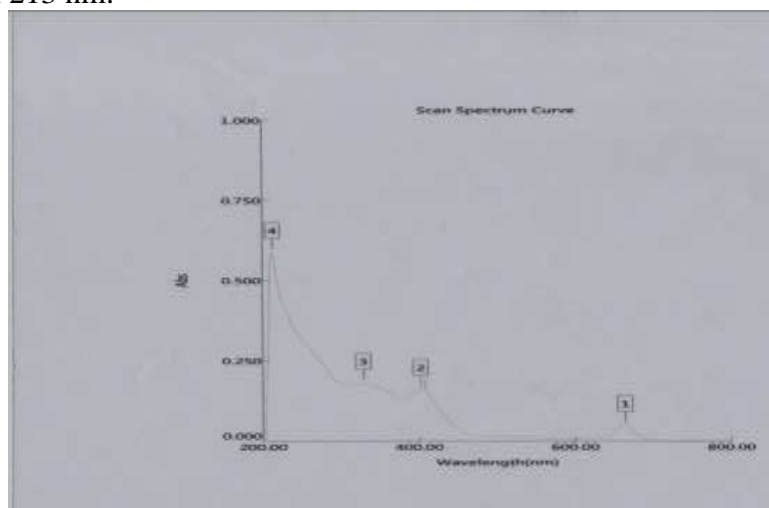


penyemprotan  $\text{FeCl}_3$  10% dibawah lampu UV 365 nm dengan nilai Rf 0,85. Hasil positif juga diduga pada identifikasi senyawa steroid terhadap ekstrak daun berenuk menggunakan fase gerak n- heksanetil asetat (4:1) ditandai dengan berfl : uoresensi biru terang dibawah lampu UV365 nm dengan nilai Rf 0,55.

**Tabel 4.** Hasil Identifikasi Senyawa dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis dimonitoring dengan lampu UV 365 nm

No	Senyawa	Hasil	Rf
1.	Alkaloid	Biru	0,82
2	Flavonoid	Hijau	0,57
3.	Fenolik	Hitam	0,85
4	Steroid	Biru terang	0,55

Pemeriksaan ekstrak daun berenuk dengan konsentrasi 60 ppm menggunakan spektrofotometer UV-Visible diperoleh empat puncak dengan panjang gelombang 664 nm, 402 nm, 329 nm dan 213 nm.



**Gambar 16.** Data Spektrofotometer UV-Visible Ekstrak Daun Berenuk

Aktivitas sitotoksik ekstrak daun berenuk terhadap *Artemia salina* Leach ditentukan berdasarkan analisa probit dan dibuat regresi linear  $y = a + bx$ , dimana  $y =$  nilai probit dan  $x =$  log konsentrasi. Persamaan tersebut digunakan untuk mengetahui nilai  $LC_{50}$  dari ekstrak daun berenuk (*Crescentia kujete*) dengan memasukkan nilai probit 5,00 (50% kematian) ke persamaan tersebut sehingga diperoleh konsentrasi yang menyebabkan 50% kematian (Priyanto, 2009).

Berdasarkan analisis probit diperoleh harga  $LC_{50}$  ekstrak daun berenuk sebesar 30,54  $\mu\text{g/ml}$  dapat dikategorikan toksik. Aktivitas sitotoksik ekstrak daun berenuk disebabkan oleh adanya kandungan senyawa metabolit sekunder golongan alkaloid, flavonoid, fenolik dan steroid. Dengan penelitian lebih lanjut, senyawa sitotoksik ini bisa dikembangkan menjadi senyawa anti bakteri, anti jamur, germisida, anti kanker dan sebagainya.

## SIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan didapatkan kesimpulan:

1. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan ekstrak daun berenuk (*Crescentia kujete L.*) diduga mengandung senyawa golongan alkaloid, flavonoid, fenolik dan steroid.
2. Pada uji sitotoksik ekstrak daun berenuk didapatkan  $LC_{50}$  30,54  $\mu$ g/ml yang berarti ekstrak daun berenuk aktif terhadap "brine shrimps" dengan tingkat sitotoksik yaitu toksik.

## SARAN

Perlu dilakukan isolasi terhadap jenis senyawa yang terkandung dalam ekstrak daun berenuk (*Crescentia kujete L.*).

## DAFTAR PUSTAKA

- Amalina, N. 2008. Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol 70% Buah Merica Hitam (*Piper nigrum L*) Terhadap sel HeLa. Skripsi. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Anggraini, P. 2008. Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol 70% Buah Kemukus (*Piper cubebaL*) Terhadap Sel HeLa. Skripsi. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2011. *Farmakope Herbal Indonesia Edisi I*. Jakarta.
- Aristyanti, D., Siswoyo, & Batubara, I. (2014). PENGARUH KADAR KIMIA TANAH TERHADAP KANDUNGAN FLAVONOID DAUN TABAT BARITO ( *Ficus deltoidea* Jack.) DEVI ARISTYANTI.
- B.N. Mayer , N.R. Ferrigini, J.E. Putnam, L.B. Jacobsen, D.E. Nichols, J. L. M. (1982). Brine-Shrimp-A-Convenient-General-Bioassay-for-Active-Plant-Constituents.pdf.
- Harborne, J. . (1987). *Metode Fisikokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung: ITB.
- Heyne, K. (1987). *Tumbuhan Berguna Indonesia*. Jakarta: Koperasi Karyawan Departemen Kehutanan.
- Indonesia, D. K. R. (2011). *Farmakope Herbal Indonesia Edisi I*. Jakarta.
- Kusuma, A. M., Susanti, & Akbariani, G. (2014). Potensi Sitotoksik Ekstrak Etanol Daun Berenuk (*Crescentia kujete L.*) Terhadap Sel Kanker.
- Marliana, E. (2007). Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dari Batang *Spatholobus ferrugineus* ( Zoll & Moritzi ) Benth, *I*, 23–29.
- Sufiana, H. (2014). Uji Aktivitas Antioksidan dan Sitotoksitas Campuran Ekstrak Metanol Kayu Sepang ( *Caesalpinia sappan L.* ) dan Kayu Kulit Manis ( *Cinnamomum burmannii B.* ), 3(2).