

## ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA YANG BERPOTENSI SEBAGAI ANTITUMOR PADA DAGING BUAH PARE (*Momordica charantia* L.)

Wiwik Susannah Rita, I W. Suirta, dan Ali Sabikin

*Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran*

---

### ABSTRAK

Isolasi dan identifikasi senyawa yang berpotensi sebagai antitumor pada buah pare telah dilakukan. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut *n*-heksana, kloroform, dan etanol. Ketiga ekstrak yang diperoleh diuji aktivitasnya dengan larva udang *Artemia salina* L.. Ekstrak yang paling toksik adalah ekstrak etanol dengan LC<sub>50</sub> 223 ppm. Pemisahan dengan kromatografi kolom menggunakan fase diam silika gel 60 dan fase gerak benzena : asam asetat (8:2) menghasilkan 3 fraksi. Uji toksisitas ketiga fraksi menunjukkan bahwa semua fraksi bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia salina* L., dengan fraksi yang paling toksik adalah fraksi 1 dengan LC<sub>50</sub> 31,62 ppm. Namun demikian yang dilanjutkan adalah fraksi 3 dengan LC<sub>50</sub> 100 ppm. Hal ini disebabkan karena fraksi 1 terdiri dari beberapa senyawa yang sulit dipisahkan secara kromatografi dan jumlah fraksi yang diperoleh sangat sedikit. Fraksi ini selanjutnya diuji kemurniannya dengan KLT dan diuji antitumor menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* A-208. Uji antitumor yang dilakukan selama 6 minggu menunjukkan bahwa fraksi 3 berpotensi sebagai antitumor pada konsentrasi 1000 ppm.

Hasil identifikasi menggunakan kromatografi gas – spektroskopi massa menunjukkan bahwa isolat aktif antitumor pada daging buah pare mengandung 3 senyawa utama, yaitu ester dioktil heksadioat, asam palmitat, dan asam stearat.

Kata kunci: antitumor, buah pare, *Artemia salina* L., *Agrobacterium tumefaciens* A-208

### ABSTRACT

Isolation and identification of the compound which has a potency as antitumor from bitter melon have been carried out. Extraction was conducted *n*-hexane, chloroform, and ethanol respectively using each extracts obtained were examined with brine shrimp lethality test. The most toxic extract was ethanol extract (LC<sub>50</sub> 223 ppm). Separation and purification of the compounds from the ethanol extract were conducted by column chromatography using a gel silica 60 as the stationary phase and benzene : acetic acid ( 8:2) as the mobile phase. This yielded 3 fractions. Then the fractions were examined with brine shrimp lethality test and the most toxic fraction was found to be the fraction 1 (LC<sub>50</sub> 31,62 ppm), but the fraction that was analysed further was fraction 3 (LC<sub>50</sub> 100 ppm), because fraction 1 consists of using compounds that were difficult to separate. The purity fraction 3 was tested conducted thin layer chromatography and its activity as antitumor agent was tested using *Agrobacterium tumefaciens* A-208. The test was in 6 weeks and that fraction 3 has a potency as an antitumor agent at 1000 ppm.

The identification with gas chromatography – mass spectroscopy indicate that the antitumor isolate from bitter melon contains 3 major compounds namely dioctyl hexadioate ester, palmitic acid, stearic acid.

Keywords: antitumor, bitter melon, *Artemia salina* L., *Agrobacterium tumefaciens* A-208

## PENDAHULUAN

Tumor ganas atau yang sering disebut kanker merupakan penyebab kematian utama kedua (untuk semua umur) di Amerika Serikat. Hampir 1 juta individu ditemukan menderita kanker setiap tahun, sekitar setengah diantaranya meninggal karena penyakit ini, sehingga merupakan salah satu ancaman yang utama terhadap kesehatan. Meskipun usaha pengobatan kanker secara intensif telah dilakukan, namun hingga kini belum ditemukan obat yang dapat mengatasi penyakit tersebut secara memuaskan. Hal ini disebabkan karena rendahnya selektifitas obat-obat antikanker yang digunakan ataupun patogenasi antikanker tersebut yang belum jelas (Yohana *et al.*, 2005; Subahar, 2004).

Penyakit ini merupakan ancaman terbesar bagi kehidupan manusia. Oleh karena itu, para ilmuwan mulai melakukan riset guna menemukan obat yang tepat untuk menyembuhkan penyakit ini. Salah satu hal yang menjadi pengamatan para ilmuwan adalah obat-obatan tradisional. Hal ini dilakukan mengingat potensi obat tradisional tersebut yang telah lama dipercaya oleh masyarakat mampu menyembuhkan penyakit tertentu (Yohana *et al.*, 2005; Rusmarini, 1996).

Salah satu obat tradisional yang telah lama dipercaya masyarakat dapat menyembuhkan penyakit kanker adalah buah pare (*Momordica charantia* L.). Di Cina, khasiat buah pare sebagai obat tradisional sudah dicatat Lisin sejak tahun 1578. Awalnya sebagai tonikum, obat cacing, obat batuk, antimalaria, sariawan, penyembuh luka, dan penambah nafsu makan. Ratusan riset juga telah banyak dilakukan untuk mengungkap efek buah pahit ini sebagai penurun kadar gula darah (*hypoglycemic effect*). Riset serupa juga dilakukan di Jerman, Inggris, India, Jepang, Thailand, dan Malaysia mempertegas khasiat pare sebagai antidiabetes (Anonim, 2006 ; Ali *et al.*, 1992).

Penemuan kandungan zat berkhasiat lain dalam buah pare sudah banyak dikerjakan. Sejak lama pare digunakan juga sebagai antikanker, antiinfeksi, dan dalam tahun-tahun belakangan terungkap pula kalau pare berkhasiat sebagai antiAIDS. Efek buah pare sebagai anti-virus HIV

terletak pada kandungan protein momorcharin alfa dan beta, atau pada protein MAP30 (Momordica Antiviral Protein 30) (Manitto, 1981 ; Anonim, 2006 ; Liu, 1993).

Buah pare yang belum masak mengandung saponin, flavonoid, dan polifenol, serta glikosida cucurbitacin, charantin, asam butirat, asam palmitat, asam linoleat, dan asam stearat. Sabira, B.; Mansoor, A.; Bina, S. S.; Abdullah; Zafar, S.; dan Mohammad juga telah berhasil mengisolasi senyawa steroid, monosiklik alkohol, dan beberapa senyawa triterpenoid (Begum *et al.*, 1996).

Pada biji buah pare telah berhasil ditemukan senyawa  $\alpha$ -momorcharin yang aktif sebagai agen antitumor, hal ini diharapkan juga akan ditemukan pada daging buah pare yaitu adanya senyawa kimia tertentu yang berpotensi sebagai agen antitumor. Oleh karena potensi buah pare yang begitu besar, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut guna mengungkap potensi buah pare khususnya sebagai antitumor (Monitto, 1981).

Skrining awal untuk menguji bahan-bahan yang diduga antitumor adalah dengan uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* L. Metode ini sering digunakan sebagai skrining awal terhadap senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak tanaman, karena relatif murah, cepat, dan hasilnya dapat dipercaya. Oleh karena itu di dalam penelitian ini, uji senyawa aktif dilakukan dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* L. sampai diperoleh isolat aktif, kemudian baru diuji antitumor dengan menggunakan bakteri *Agrobacterium tumefaciens* A-208 untuk memastikan apakah isolat yang diperoleh benar-benar bersifat antitumor (Ledenberg, 1992).

## MATERI DAN METODE

### Bahan

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah kloroform, *n*-heksana, etanol, dimetilsulfoksida, etil asetat, akuades, asam asetat, asam sulfat pekat, silika gel GF 254, silika gel 60, dan natrium hidroksida, pereaksi pendeteksi untuk : alkaloid, flavonoid, steroid, dan terpenoid.

## Peralatan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi pisau, seperangkat alat penumbuk, blender, gelas beker, neraca analitik, erlenmeyer, corong pisah, kolom kromatografi, kertas saring, kain kasa, toples, akuarium, labu ukur, pipet volum, pipet tetes, pipet ukur, pipet mikro, tabung reaksi, bejana kromatografi lapis tipis, *rotary vacuum evaporator*, lampu Ultra Violet untuk penampak bercak noda, tusuk gigi, Kromatografi Gas – Spektroskopi Massa.

## Cara kerja

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah daging buah pare yang diperoleh dari pasar Jimbaran Bali pada bulan Maret Tahun 2004. Selanjutnya sekitar 35 kg buah pare dikumpulkan dan dibersihkan, kemudian buah pare dicelupkan ke dalam alkohol (etanol) mendidih yang bertujuan untuk menghentikan proses metabolisme. Selanjutnya dipotong kecil-kecil dan dikeringkan dengan cara diletakkan di tempat terbuka dengan sirkulasi udara yang baik dan tidak terkena sinar matahari langsung. Buah pare yang sudah kering kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender sehingga menjadi serbuk.

Serbuk buah pare ditimbang sebanyak 1000 g dan diekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut n-heksana selama 24 jam kemudian disaring. Setelah itu ampas dikeringkan hingga terbebas dari pelarut n-heksana dan dimaserasi kembali selama 24 jam menggunakan kloroform. Setelah itu ampas kembali dikeringkan sampai terbebas dari pelarutnya. Selanjutnya dimaserasi kembali dengan pelarut etanol selama 24 jam kemudian disaring. Ketiga ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* sampai diperoleh ekstrak pekat kloroform, etanol, dan n-heksana.

Ketiga ekstrak pekat yang diperoleh selanjutnya diuji toksisitasnya dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* L.

Media *brine shrimp* dibuat dengan menyaring air laut secukupnya. Medium tersebut kemudian dimasukkan ke dalam akuarium yang memiliki sekat berlubang. Satu bagian dari akuarium tersebut dibuat terang sedangkan bagian yang lain dibuat gelap. Telur udang

dimasukkan pada bagian yang gelap, selanjutnya akuarium disimpan pada tempat yang memiliki penerangan yang cukup selama 48 jam.

Botol disiapkan untuk pengujian, dimana masing-masing sampel dibutuhkan 9 botol dan satu botol sebagai kontrol. Ekstrak kental n-heksana, kloroform, dan etanol ditimbang sebanyak 20 mg dan dilarutkan dengan menggunakan pelarutnya masing-masing. Selanjutnya larutan yang diperoleh dipipet masing-masing sebanyak 500  $\mu$ L, 50  $\mu$ L, dan 5  $\mu$ L, dan dimasukkan ke dalam botol, pelarutnya diuapkan selama 24 jam, selanjutnya dimasukkan 2 mL air laut, 50  $\mu$ L dimetil sulfoksida, 10 ekor larva udang, dan setetes larutan ragi roti, kemudian ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 5 mL, sehingga konsentrasinya masing-masing menjadi 10, 100, dan 1000 ppm.

Untuk kontrol, ke dalam botol dimasukkan 2 mL air laut, 50  $\mu$ L dimetil sulfoksida, 10 ekor larva udang dan setetes larutan ragi roti, kemudian ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 5 mL. Pengamatan dilakukan selama 24 jam terhadap kematian larva udang. Analisis data kemudian dilakukan untuk mencari ( $LC_{50}$ ).

Ekstrak aktif yang diperoleh selanjutnya di kromatografi lapis tipis (KLT) dengan menggunakan fase diam silika gel GF<sub>254</sub> yang bertujuan untuk mencari eluen yang nantinya akan digunakan sebagai eluen dalam kromatografi kolom. Dari hasil kolom akan diperoleh beberapa eluat yang ditampung dalam botol setiap 2 mL. Selanjutnya eluat itu digabungkan dengan menggunakan KLT penggabungan sehingga diperoleh beberapa fraksi. Fraksi-fraksi tersebut diuji toksisitasnya dengan menggunakan *Artemia salina* L. Analisis data selanjutnya dilakukan untuk mencari  $LC_{50}$  fraksi aktif yang diperoleh selanjutnya diuji kemurnian dengan KLT. Fraksi yang telah murni secara KLT selanjutnya di uji antitumor dengan menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* A-208 dan diidentifikasi dengan pereaksi warna dan Kromatografi Gas - Spektroskopi Massa.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Ekstraksi

Sebanyak 1000 g serbuk buah pare diekstraksi berturut-turut dengan 6 L *n*-heksana, 4 L kloroform, dan 4 L etanol, selanjutnya ketiga ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator*, sehingga diperoleh ekstrak kental *n*-heksana berwarna hijau sebanyak 4,62 g, ekstrak kental kloroform berwarna hijau sebanyak 11,68 g, dan ekstrak kental metanol berwarna hijau pekat sebanyak 26,09 g.

Uji toksisitas terhadap ketiga ekstrak yang diperoleh menunjukkan bahwa ekstrak etanol dan *n*-heksana bersifat toksik dengan  $LC_{50}$  kurang dari 1000 ppm yaitu, 223 dan 602,55 sedang ekstrak kloroform tidak dikatakan bersifat toksik karena nilai  $LC_{50}$  lebih dari 1000 ppm.

### Pemisahan dan Pemurnian

Ekstrak yang paling aktif (etanol) selanjutnya dipisahkan dengan menggunakan kromatografi kolom dengan fase diam silika gel 60 dan fase gerak terbaik yang diperoleh dari KLT, yaitu asam asetat: benzena (2:8). Hasil dari kromatografi kolom diperoleh 115 fraksi. Fraksi yang diperoleh selanjutnya digabungkan dengan KLT penggabungan dan diperoleh 3 fraksi dengan berat fraksi 1, 2, dan 3 berturut-turut adalah 0,41; 0,37; dan 0,30. Fraksi ini selanjutnya diuji toksisitasnya dengan larva udang dan diperoleh ketiga fraksi bersifat aktif toksik dengan  $LC_{50}$  untuk fraksi 1, 2, dan 3 berturut-turut adalah

31,62; 120; dan 100 terlihat bahwa fraksi 1 merupakan fraksi yang paling aktif toksik, namun yang dilanjutkan adalah fraksi 3, hal ini disebabkan karena fraksi 1 merupakan gabungan dari beberapa senyawa yang jarak noda satu dengan noda lainnya sangat berdekatan dan berekor, hal ini mengakibatkan noda-noda tersebut sangat susah dipisahkan. Walaupun sudah dilakukan pencarian eluen dengan menggunakan campuran dari beberapa pelarut, namun belum ditemukan pelarut yang tepat untuk memisahkan, selain itu juga jumlah fraksi 1 yang relatif cukup sedikit, sehingga nantinya kalau dipaksakan untuk melakukan pemisahan diawatirkan jumlah sampel yang diperoleh sedikit sehingga analisis lebih lanjut tidak dapat dikerjakan, sehingga yang dilanjutkan adalah fraksi 3, karena fraksi 3 relatif cukup toksik dengan  $LC_{50}$  100 ppm.

Fraksi 3 selanjutnya diuji kemurnian dengan menggunakan KLT diperoleh bahwa fraksi 3 relatif murni secara KLT. Isolat ini selanjutnya diuji antitumor dengan menggunakan *Agrobacterium tumefaciens A-208* dan diperoleh bahwa isolat 3 positif sebagai antitumor pada konsentrasi 1000 ppm. Isolat ini selanjutnya diidentifikasi dengan pereaksi warna dan Kromatografi Gas - Spektroskopi Massa.

### Identifikasi dengan Pereaksi Warna

Isolat aktif antitumor yang diperoleh selanjutnya diuji golongan fitokimianya dengan menggunakan beberapa pereaksi pendeteksi golongan dengan hasil seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji warna isolat aktif antitumor

Senyawa	Pereaksi	Hasil /warna	Kesimpulan
Alkaloid	Mayer	Tidak terbentuk endapan	-
	Wagner	Tidak terbentuk endapan	-
	NaOH 10%	Tidak terbentuk endapan	-
Flavonoid	Willstater	Tidak terjadi perubahan	-
	Smith-Matcalfe	Tidak terjadi perubahan	-
	NaOH 10%	Tidak terjadi perubahan	-
Triterpen	L-B	Coklat	+
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Pekat	Coklat	+
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 50%	Coklat	+

Setelah diuji dengan menggunakan pereaksi pendeteksi, reaksi positif hanya ditunjukkan pada pereaksi-pereaksi terpenoid yaitu dengan Lieberman-Burchard (L-B) memberikan perubahan warna menjadi coklat dengan  $H_2SO_4$  memberikan warna coklat, dan dengan menggunakan  $H_2SO_4$  50% juga memberikan warna coklat, jadi kemungkinan Isolat yang diperoleh adalah terpenoid jenuh atau bahkan negatif terpenoid hal ini disebabkan karena asam-asam lemak juga dapat bereaksi dengan pereaksi-pereaksi diatas menghasilkan warna yang sama yaitu warna coklat.

### Identifikasi dengan Kromatografi Gas - Spektroskopi Massa.

Isolat aktif antitumor yang diperoleh selanjutnya dikarakterisasi dengan Kromatografi Gas - Spektroskopi Massa. Hasil dari Kromatografi Gas-Spektroskopi Massa menunjukkan adanya beberapa puncak yang mengindikasikan bahwa isolat yang diperoleh belum murni. Namun demikian dalam isolat mengandung beberapa puncak senyawa yang relatif cukup besar seperti puncak senyawa yang memiliki waktu retensi (tr) 15,42 ; 17, 31; dan 19.37 menit. Senyawa utama ditunjukkan pada waktu retensi 17.31 menit.

Spektrum senyawa I dengan tr 15, 41 menit. Pada spektrum tersebut terlihat adanya ion-ion pada  $m/z$  256( $M^+$ ) dan  $m/z$  73 (puncak dasar). Ion molekul pada  $m/z$  256 mengindikasikan berat molekul 256, yang berdasarkan literature dalam data base identik dengan asam heksadekanat.

Spektrum senyawa II dengan tr 17, 31 menit Pada spektrum tersebut terlihat adanya ion-ion pada  $m/z$  284 ( $M^+$ ) dan  $m/z$  73 (puncak dasar). Ion molekul pada  $m/z$  284 menunjukkan berat molekul senyawa II adalah 284. Berdasarkan data literatur dalam data base senyawa ini identik dengan asam oktadekanat.

Spektrum senyawa III dengan tr 19, 37 menit. Berdasarkan data *library* NIST02.L senyawa ini identik dengan ester dioktil heksadioat ( $C_{22}H_{44}O_4$ ) mempunyai berat molekul 370 dengan demikian ion molekul senyawa III adalah 370. Tidak terlihatnya ion molekul senyawa diatas kemungkinan disebabkan tidak

stabilnya ion molekul dari senyawa tersebut ( $C_{22}H_{44}O_4^+$ ).

## SIMPULAN DAN SARAN

### Simpulan

Hasil penelitian dan pembahasan dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Ekstrak etanol dari buah pare (*Momordica charantia* L.) bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia salina* L. dengan  $LC_{50}$  230 ppm.
2. Dari uji aktivitas antitumor dengan *bacterium tumefaciens* A-208 terhadap isolat aktif toksik menunjukkan bahwa isolat tersebut aktif antitumor.
3. Isolat yang bersifat antitumor dari buah pare diduga gabungan dari beberapa senyawa dengan 3 senyawa mayor yang sebagian besar merupakan asam-asam organik, ketiga senyawa tersebut yaitu, asam heksadekanat, Asam oktadekanat, dan ester dioktilheksadioat.

### Saran

Hasil identifikasi dengan menggunakan Kromatografi Gas - Spektroskopi Massa diperoleh data bahwa isolat 3 merupakan gabungan dari beberapa senyawa sehingga perlu dilakukan pemisahan terhadap isolat 3 serta uji senyawa hasil pemisahan dari isolat 3 tersebut sehingga nantinya akan diperoleh senyawa tunggal yang bersifat antitumor.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Bapak Drs. I Made Siaka, M.Sc.(Hons), Bapak Drs. I Made Sukadana, M.Si. dan Ibu Ir. Wahyu Dwijani Sulishingtiyas, M.Kes. atas masukan dan sarannya sehingga penelitian ini dapat dilaksanakan dengan baik.

## DAFTAR PUSTAKA

Anonim, 2006, Khasiat dan Kegunaan Senyawa Kimia dalam Buah Pare,

- <http://www.Kompas.com/kesehatan/news/0207/02/192257.htm>, 23 Pebruari 2006
- Ali, Liaguai, Abul Kalam, A. K. M., Ikbal, R. M., Mohammad. M, Nilufaz. R, Muhammad N. A., and Begun R., 1992, Studies on Hypoglycemic Effects of Fruit Pulp, Seed, and Whole Plant of *Momordica Charantia* on Normal and Diabetic Model Rats, *Planta Med.*, Volume 20, 408-412
- Begun. S., Mansoor. A., Bina S. S., Abdulkhan, Zafar S. S., and Mohammad A., 1996, Triterpenes, a Sterol, and a Monocyclic Alkohol from *Momordica Charantia*, *Phytochemistry*, Volume 44 (2), 1313-1319
- Ledenberg, J., 1992. *Encyclopedia of Microbiology*, Volume Academic Press Inc, Rockefeller University, New York
- Liu, W. K., S. F. Sze, and H. W. Yeung, 1993, Action of  $\alpha$ -Momorcharin, a Ribosoma Inactivating Protein, on Cultured Tumor Cell Lines, *Gen. Pharmac*, Volume 25 (4), 75-77
- Manitto, P., 1981, *Biosintesis Produk Alam*, a.b. Koensoemardyah, IKIP Semarang, Semarang
- Rusmarini, I. A., 1996, *Pengobatan Tanaman Obat Bali*, Edisi ke-2, Puri Damai, Denpasar
- Subahar Tati S., 2004, *Khasiat dan Manfaat Pare*, Penerbit Agromedia Pustaka, Jakarta
- Yohana, Arisandi, dan Yovita Andriani, 2005, *Khasiat Tanaman Obat*, Pustaka Buku Murah, Jakarta