

UJI TOKSISITAS EKSTRAK DAN ISOLAT DAUN SRIKAYA (*Annona squamosa* Linn) DAN IDENTIFIKASI SENYAWANYA

Ni Luh Indra Dewi Senisk*, I Made Dira Swantara, Ida Ayu Raka Astiti Asih
Program Studi Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Udayana, Badung, Bali, Indonesia, 80361
*indradewi565@gmail.com

ABSTRAK: Srikaya (*Annona squamosa* Linn) merupakan tanaman yang mengandung banyak manfaat yaitu pencegahan penyakit jantung, mencegah penyakit asma, mengatasi penyakit diabetes, mengobati masalah hipertensi mencegah dan mengobati penyakit kanker. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas toksik ekstrak dan isolat daun srikaya serta identifikasi kandungan senyawanya. Metode *Brine Shrimp Mortality Test* (BSLT) digunakan untuk uji toksisitas dan identifikasi senyawa dengan menggunakan instrumen LC MS/MS. Maserasi 750 g serbuk daun srikaya kering menggunakan pelarut metanol menghasilkan 64,45 g ekstrak kental. Uji toksisitas ekstrak kental metanol menunjukkan nilai LC₅₀ sebesar 26,30 ppm. Partisi 45,0 g ekstrak kental metanol menghasilkan 14,3 g ekstrak n-heksana, 2,57 g kloroform dan 9,05 g n-butanol dengan nilai LC₅₀ berturut-turut 104,71; 52,48; dan 323,59 ppm. Pemisahan senyawa pada ekstrak kloroform dilakukan dengan kromatografi kolom menghasilkan empat fraksi dengan fraksi A menunjukkan aktivitas paling toksik dengan nilai LC₅₀ sebesar 100,00 ppm. Analisis LC MS/MS fraksi A menunjukkan adanya senyawa (*6S,7αR*)-6-hydroxy-4,4,7α-trimethyl-6,7-dihydro-5H-1-benzofuran-2-one (*Loliolide*); *Cocamidopropyl betaine*; *Linolenic Acid*; dan *1-Dodecyl-2-azepanon* (*Laurocapram*).

Kata kunci: toksisitas, srikaya (*Annona squamosa* Linn), BSLT, *Artemia salina* Leach

ABSTRACT: Sugar apple (*Annona squamosa* Linn) has many benefits, i.e. preventing heart disease, preventing asthma, overcoming diabetes, treating hypertension problems, preventing and treating cancer. This research aims to find out the toxicity of sugar apple leaf extract and isolate and to identify their compounds. Brine Shrimp Mortality Test (BSLT) method was used for toxicity test and identification compounds carried out using the LC MS/MS instrument. Maceration of 750 g of dry sugar apple leaf powder using methanol as solvent yielded 64.45 g of thick extract. Toxicity test of methanol viscous extract showed an LC₅₀ value of 26.30 ppm. Partition of 45.0 g of methanol thick extract produced 14.3 g of n-hexane extract, 2.57 g of chloroform and 9.05 g of n-butanol with LC₅₀ values of 104.71; 52.48; and 323.59 ppm respectively. The separation of compounds in the chloroform extract was carried out by column chromatography resulting in four fractions with fraction A showing the highest toxicity with an LC₅₀ value of 100.00 ppm. LC MS/MS analysis of fraction A showed the presence of compound (*6S,7αR*)-6-hydroxy-4,4,7α-trimethyl-6,7-dihydro-5H-1-benzofuran-2-one (*Loliolide*) ; *Cocamidopropyl betaine*; *Linolenic Acid* and *1-Dodecyl-2-azepanon* (*Laurocapram*).

Keywords: toxicity, sugar apple (*Annona squamosa* Linn), BSLT, *Artemia salina* Leach

1. PENDAHULUAN

Penyakit kanker mempengaruhi kinerja dari organ dalam tubuh, penyebabnya adalah

pertumbuhan sel yang tidak normal [1]. Hingga saat ini sudah banyak prosedur

pengobatan untuk penyakit kanker yang meliputi terapi medis dan non medis. Efektivitas dari pengobatan diatas masih kurang dan banyak efek samping yang ditimbulkan dari berbagai terapi yang dilakukan seperti rambut rontok, mual, muntah, gangguan tidur, lelah, gangguan pada mata, kemerahan pada kulit, penurunan atau peningkatan berat badan, sariawan, kesemutan dan konstipasi [2]. Banyaknya efek samping yang ditimbulkan tersebut mendorong munculnya penelitian-penelitian untuk mencari obat alternatif yang berasal dari alam yang dianggap memiliki efek samping lebih sedikit bahkan tidak memberi efek samping sama sekali. Obat alternatif dari bahan alam ini mengandung senyawa antikanker sehingga dapat menghambat pertumbuhan sel kanker pada tubuh. Senyawa yang berperan sebagai agen antikanker dapat ditemui pada banyak tanaman dan tumbuhan. Satu antara banyak bahan obat konvensional yang dipercaya di masyarakat sebagai obat antikanker yaitu srikaya (*Annona squamosa* Linn).

Srikaya merupakan tanaman yang mengandung banyak manfaat yaitu pencegahan penyakit jantung, mengatasi penyakit disentri akut dan diare, mencegah dan mengobati penyakit kanker, mencegah penyakit asma, mengatasi penyakit diabetes, mengobati masalah hipertensi, mengobati masalah kulit dan antiradang [3]. Kandungan metabolit sekunder pada daun srikaya antara lain karbohidrat, protein, saponin, tanin, polifenol, fitosterol, asam amino, terpenoid dan alkaloid [4].

Sebagai uji awal aktivitas antikanker suatu bahan digunakan uji toksisitas dengan metode *BSLT*. Metode ini merupakan metode yang singkat serta ekonomis untuk uji awal aktivitas toksik dari ekstrak tanaman dengan menggunakan larva *Artemia salina* Leach sebagai bioindikator[5]. Adanya aktivitas biologi suatu bahan bisa diukur dengan

memperhitungkan jumlah kematian larva *A. salina* dampak dari pemberian senyawa pada konsentrasi tertentu. Hasilnya dikatakan toksik apabila bahan yang diuji menyebabkan 50% kematian pada konsentrasi kurang dari 1000 ppm ($LC_{50} < 1000$ ppm).

Berdasarkan latar belakang diatas, dilakukan studi lebih lanjut mengenai toksisitas ekstrak dan isolat daun srikaya dan identifikasi senyawanya.

2. PERCOBAAN

2.1 Bahan dan Peralatan

Bahan yang digunakan meliputi daun srikaya, larva *A. salina*, metanol, air laut, akuades, n-heksana, kloroform, etil asetat, n-butanol, asam sulfat pekat, asam klorida 0,1 N, pereaksi Dragendorff, pereaksi Meyer, pereaksi Wagner, natrium hidroksida 10%, asam klorida pekat, serbuk Magnesium, pereaksi Liebermann-Burchard, asam sulfat 50% dan feri klorida 1%.

Alat-alat yang digunakan berupa botol, corong, toples/botol kaca, blender, gunting, kertas saring, tabung reaksi, pipa kapiler, plat tetes, penangas air, botol vial, batang pengaduk, oven, silika gel 60, Beaker, pipet tetes, kolom kromatografi, lampu UV, bejana kromatografi, silika gel GF₂₅₄, neraca, corong pisah, *Rotary vacuum evaporator*, dan instrumen analisis LC-MS/MS.

2.2 Metode

2.2.1 Penyiapan sampel

Daun srikaya yang dikumpulkan dibersihkan, dipotong lalu dikeringkan tanpa terkena cahaya matahari. Kemudian dihaluskan dengan blender hingga menjadi bubuk dan ditentukan kadar airnya.

2.2.2 Ekstraksi

Serbuk daun srikaya sebanyak 750 g dimaserasi dengan pelarut metanol. Hasil ekstrak yang sudah dimaserasi kemudian diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary*

vacuum evaporator kemudian mendapatkan hasil ekstrak kasar. Ekstrak kasar ini kemudian dilarutkan dalam campuran metanol-air dalam perbandingan 7:3 lalu diuapkan metanolnya dan diperoleh ekstrak air yang lalu dipartisi secara berurutan dengan n-heksana, kloroform dan n-butanol. Ekstrak yang diperoleh lalu dilakukan proses penguapan pada pelarutnya untuk kemudian diuji toksisitasnya.

2.2.3 Uji toksisitas

Uji toksisitas dilakukan pada ekstrak, fraksi dan isolat yang diperoleh dengan menggunakan larva *Artemia salina* pada metode Meyer (1982). Penetasan larva dilakukan dengan menyiapkan akuarium yang tersekat dengan sekat berlubang menjadi dua bagian yaitu satu bagian yang dibuat gelap dan bagian lain dibiarkan terbuka kemudian diisi dengan air laut yang sudah di filter. Telur *Artemia salina* Leach dimasukkan ke wadah kaca atau akuarium pada bagian gelap. Akuarium kemudian diletakkan di tempat yang cukup terang selama 48 jam dan siap digunakan untuk pengujian. Disiapkan ekstrak yang akan diuji dengan konsentrasi 1000; 100 dan 10 µg/mL dalam air laut.

Larva *A. salina* sejumlah 10 ekor dimasukkan ke botol vial yang dicampur 100 µL air laut, ditambahkan larutan yang akan diuji sehingga memiliki konsentrasi masing-masing 10, 100, dan 1000 µg/mL. Larutan diaduk, dilakukan tiga kali pengulangan tiap konsentrasi dan kontrol dibuat tanpa menambahkan sampel, lalu diamkan selama satu hari atau 24 jam, lalu melakukan perhitungan jumlah larva *A. salina* yang masih hidup dan yang mati. Pada perhitungan data analisa tersebut menggunakan metode persentase mortalitas larva *A. salina* pada masing-masing konsentrasi. Dibuat grafik antara log konsentrasi terhadap mortalitas. Nilai LC_{50} diperoleh dengan cara menarik garis pada nilai 50% dari sumbu mortalitas sampai

memotong sumbu grafik, titik potong antara garis yang ditarik ke garis konsentrasi dimana sampel/bahan menyebabkan kematian 50% larva disebut LC_{50} [6].

2.2.4 Uji fitokimia

2.2.4.1 Uji alkaloid

Ekstrak ditambahkan HCl 0,1 N. Pereaksi Meyer ditambahkan pada tabung pertama dan pereaksi Dragendorff ditambahkan pada tabung kedua masing-masing sebanyak 3 tetes. Terbentuknya endapan putih pada tabung pertama dan endapan jingga pada tabung kedua menunjukkan kandungan senyawa alkaloid.

2.2.4.2 Uji flavonoid

Ekstrak ditambahkan beberapa tetes HCl pekat dan potongan kecil logam Mg. Perubahan warna menjadi jingga menunjukkan kandungan senyawa flavonoid.

2.2.4.3 Uji terpenoid dan steroid

Ekstrak ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard. perubahan warna menjadi ungu-merah-coklat menunjukkan kandungan senyawa triterpenoid dan perubahan warna menjadi warna hijau-biru menunjukkan kandungan senyawa steroid.

2.2.4.4 Uji tanin

Ekstrak ditambahkan $FeCl_3$ 1%. perubahan warna menjadi ungu, biru atau hitam menunjukkan kandungan senyawa tanin.

2.2.4.5 Uji saponin

Akuades ditambahkan pada ekstrak sampai seluruh sampel terendam, dididihkan selama beberapa menit, didinginkan, lalu dikocok dengan kuat. Timbulnya buih stabil menunjukkan kandungan senyawa saponin.

2.2.4.6 Uji fenol

Ekstrak ditambahkan beberapa $FeCl_3$. perubahan warna menjadi biru atau hitam menunjukkan adanya senyawa fenol.

2.2.5 Pemisahan

Ekstrak hasil partisi yang paling toksik kemudian dikromatografi kolom dengan menggunakan campuran fase gerak n-heksana – kloroform (1:4). Eluat ditampung tiap 3 mL dalam botol vial dan dianalisis dengan KLT, eluat dengan pola noda yang sama digabungkan kemudian diuji toksisitasnya.

2.2.6 Identifikasi dengan LC-MS/MS

Fraksi hasil kromatografi kolom yang paling toksik terhadap larva *A. salina* diidentifikasi menggunakan LC-MS/MS ACQUITY UPLC Xevo G2-S QToF WATERS.

3. HASIL dan PEMBAHASAN

3.1 Penyiapan sampel

Sampel daun dicuci hingga bersih untuk menghilangkan residu dari tanah atau kotoran yang menempel dan dipotong untuk mempercepat proses pengeringan. Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kandungan air dan meminimalisir tumbuhnya mikroba. Sampel dikeringkan tanpa terkena sinar matahari secara langsung agar metabolit sekunder yang terkandung pada sampel tidak rusak terutama senyawa dengan titik didih rendah atau senyawa yang mudah terdegradasi oleh sinar UV. Sampel kering lalu digiling dengan menggunakan blender sehingga berbentuk serbuk yang bertujuan untuk memperluas permukaan

sampel sehingga memperbesar kontak dengan pelarut.

Pengukuran kadar air dilakukan pada sampel daun srikaya yang telah dikeringkan. Prinsip dari pengukuran kadar air ialah menghilangkan air pada sampel dengan pemanasan pada suhu 105°C dalam jangka waktu tertentu. Kadar air sampel yang diperoleh pada penelitian ini sebesar $8,13 \pm 0,1$ %.

3.2 Ekstraksi

Hasil maserasi dari 750 g serbuk daun srikaya (*Annona squamosa* L.) didapatkan ekstrak kental metanol sebanyak 64,45 g yang berwarna hijau kehitaman dengan rendemen sebesar 8,59%. Ekstrak metanol sebanyak 45,0 g dipartisi berurutan dengan n-heksana, kloroform dan n-butanol diperoleh ekstrak berturut-turut sebesar 14,3 g; 2,57 g; 9,05 g.

3.3 Uji toksisitas

Tabel 1 menunjukkan ekstrak metanol daun srikaya bersifat paling toksik. Ekstrak metanol dan n-heksana dikategorikan sebagai toksik tinggi/sangat toksik karena menunjukkan nilai LC_{50} lebih kecil dari 100 ppm sedangkan ekstrak n-heksana dan n-butanol dikategorikan sebagai toksik sedang karena menunjukkan nilai LC_{50} antara 100-500 ppm.

Tabel 1. Hasil Uji Toksisitas Ekstrak Daun Srikaya

Jenis Ekstrak	Mortalitas \pm SD (%)			LC_{50} (ppm)
	10 ppm	100 ppm	1000 ppm	
metanol	17,73 \pm 7,51	92,09 \pm 7,70	100 \pm 0	26,30
n-heksana	16,69 \pm 3,40	48,38 \pm 1,07	93,99 \pm 0,21	104,71
kloroform	19,58 \pm 0,72	61,91 \pm 4,13	94,64 \pm 0,17	52,48
n-butanol	3,34 \pm 2,89	20,94 \pm 3,70	3,34 \pm 2,89	323,59

Tabel 2. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Kloroform Daun Srikaya

Uji Fitokimia	Pereaksi	Perubahan yang Timbul	Hasil
Alkaloid	Dragendorff	Tidak ada	-
	Meyer	Tidak ada	-
Flavonoid	Willstater	Jingga	+
	Liebermann-Burchard	Merah	+
Triterpenoid	Liebermann-Burchard	Biru kehitaman	+
Tanin	Akuades-FeCl ₃	Tidak ada	-
Fenol	Metanol-FeCl ₃	Biru kehitaman	+
Saponin	Akuades-HCl	Tidak ada	-

3.4 Uji Fitokimia

Skrining fitokimia yang dilakukan pada ekstrak kloroform antara lain uji alkaloid, flavonoid, steroid, triterpenoid, tannin dan fenol. Hasil skrining fitokimia ditunjukkan pada Tabel 2. Ekstrak kloroform daun srikaya mengandung senyawa flavonoid, steroid, teriterpenoid dan fenol.

3.5 Pemisahan

Pemisahan ekstrak kloroform dengan kromatografi kolom dilakukan dengan menggunakan fase diam silica gel 60 dengan fase gerak campuran dari n-heksana:kloroform (1:4). Hasil pemisahan 1,5 g ekstrak kloroform menghasilkan 206 botol eluat yang ditampung tiap 3 mL dalam botol vial. Ekstrak yang masih terikat dalam silica gel dielusi menggunakan metanol dan eluatnya ditampung. Selanjutnya, masing-masing eluat yang diperoleh dilihat pola nodanya menggunakan kromatografi lapis tipis menggunakan eluen n-heksana : kloroform (1:4) untuk menggabungkan eluat

yang mempunyai pola noda sama. Eluat yang mempunyai pola noda sama memiliki senyawa yang hampir sama. Pola noda tersebut dideteksi dengan menggunakan lampu UV₂₅₄ dan UV₃₆₆. Berdasarkan pola noda masing-masing eluat, dihasilkan 4 fraksi seperti disajikan pada Tabel 3.

Fraksi dari hasil kolom kromatografi selanjutnya diuji toksisitasnya terhadap larva *A. salina*. Uji toksisitas masing-masing fraksi dilakukan untuk mengetahui fraksi yang paling toksik dan berpotensi sebagai antikanker yang akan dilanjutkan ke proses identifikasi. Hasil uji toksisitas keempat fraksi disajikan pada Tabel 4.

Fraksi dari hasil kolom kromatografi dikategorikan sebagai toksik sedang karena menunjukkan nilai LC₅₀ antara 100-500 ppm. Hasil uji toksisitas menunjukkan ekstrak metanol memiliki nilai LC₅₀ paling kecil yang menunjukkan ekstrak metanol bersifat paling toksik. Hal ini dapat disebabkan oleh senyawa yang terkandung dalam ekstrak metanol bekerja dalam sinergis.

Tabel 3. Hasil Kromatografi Kolom Ekstrak Kloroform Daun Srikaya

Fraksi	Jumlah noda	Nilai Rf	Berat (g)
A (1-25)	3	3,1 ; 3,7 ; 4,1	0,0309
B (26-100)	2	1,7 ; 2,4	0,0156
C (101-145)	2	0,8 ; 1,4	0,0089
D (146-206)	1	0,8	0,0289

Tabel 4. Hasil Uji Toksisitas Fraksi Hasil Kromatografi Kolom

Fraksi	Mortalitas \pm SD (ppm)			LC ₅₀ (ppm)
	10 ppm	100 ppm	1000 ppm	
A	17,36 \pm 1,20	50,16 \pm 6,04	90,30 \pm 3,58	100,00
B	10,17 \pm 0,30	36,90 \pm 1,03	82,22 \pm 3,85	204,17
C	22,55 \pm 4,24	59,53 \pm 8,25	94,53 \pm 0,36	316,22
D	4,61 \pm 0,12	20,47 \pm 0,82	71,79 \pm 4,43	407,38

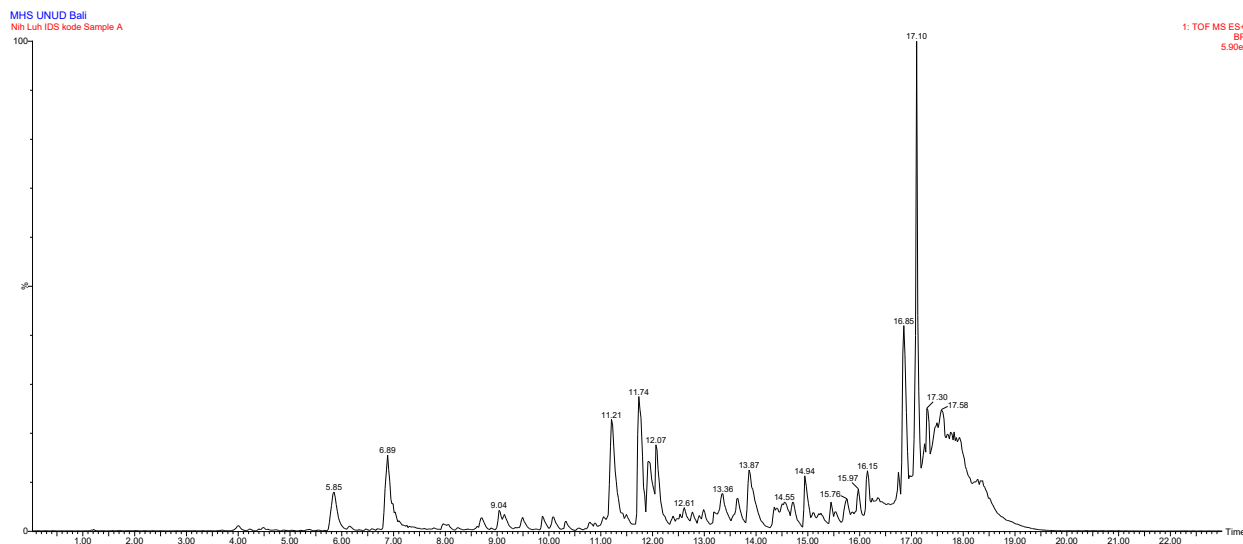
3.6 Identifikasi dengan LC-MS/MS

Berdasarkan kromatogram pada Gambar 1 diperoleh 16 puncak namun hanya 4 puncak yang dapat dianalisis. Hasil analisis fraksi A daun srikaya dengan dugaan senyawanya dapat dilihat pada Tabel 5.

Berdasarkan kromatogram fraksi A pada Gambar 4.6, diperoleh 16 puncak namun hanya 4 puncak yang dapat dianalisis dan 12 puncak lainnya tidak dapat diidentifikasi lebih lanjut, karena tidak adanya kemiripan antara spektrum massa dengan database

ataupun tidak ada spektrum massa senyawa tersebut pada database.

Senyawa [(6*S*,7*aR*)-6-hydroxy-4,4,7*a*-trimethyl-6,7-dihydro-5*H*-1-benzofuran-2-one atau Loliolide] diduga memiliki peran pada aktivitas antikanker fraksi A. Hal ini didukung dengan hasil penelitian yang mengatakan bahwa pada ekstrak metanol daun kecap mempunyai aktivitas antikanker terhadap Murine cell leukemia P-388 dengan nilai IC₅₀ sebesar 13,86 μ g/mL dan dengan Loliolide sebagai senyawa yang memiliki peran sebagai antikanker pada ekstrak ini [7].



Gambar 1. Kromatogram LC-MS/MS Fraksi A

Tabel 5. Hasil Analisis Spektra Massa dan Dugaan Senyawa Fraksi A

Waktu Retensi (Rt) (menit)	Ion M ⁺ (m/z)	Rumus Molekul	Dugaan Senyawa	Golongan Senyawa
5,851	197.1178	C ₁₁ H ₁₆ O ₃	• (6 <i>S</i> ,7 <i>αR</i>)-6-hydroxy-4,4,7 <i>α</i> -trimethyl-6,7-dihydro-5 <i>H</i> -1-benzofuran-2-one atau Loliolide	Monoterpenoid
9,894	343.2959	C ₁₉ H ₃₈ N ₂ O ₃	• Cocamidopropyl betaine	Amina
13,213	279.2314	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	• Linolenic acid	Asam Lemak
15,448	282.2814	C ₁₈ H ₃₅ NO	• 1-Dodecyl-2-azepanon atau Laurocapram	Alkaloid

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, dapat disimpulkan fraksi A dari hasil kromatografi kolom ekstrak kloroform daun srikaya bersifat paling toksik dengan nilai LC₅₀ sebesar 100,0 ppm. Hasil identifikasi instrument LC-MS/MS menunjukkan fraksi A mengandung senyawa (6*S*,7*αR*)-6-hydroxy-4,4,7*α*-trimethyl-6,7-dihydro-5*H*-1-benzofuran-2-one (Loliolide); Cocamidopropyl betaine; Linolenic Acid; dan 1-Dodecyl-2-azepanon (Laurocapram). Senyawa Loliolide yang merupakan golongan senyawa monoterpenoid diduga berperan sebagai antikanker.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengungkapkan terimakasih kepada semua pihak yang telah ikut serta mendukung penulis dalam proses menyelesaikan penelitian ini.

6. DAFTAR PUSTAKA

- [1] Akmal M, Zely I, Widhawati, Sekar S. 2010. Ensiklopedi Kesehatan Untuk Umum. Ar-Ruzz Media. Yogyakarta.
- [2] Love, R.R., Leventhal, H., Esaterling, D.V., dan Nerenz, D.R. 1989. Side Effects and Emotional During Cancer

Chemoteraphy. Jurnal Cancer 63(3): 12-604.

- [3] Nurjanah, N., dan Ihsan, N., 2013, Ancaman dibalik Segarnya Buah dan Sayur, Pustaka Bunda. Jakarta..
- [4] Tansil, Sukmawati, Mahmud Ghaznawie dan Gabriela Reginata. 2016. Deteksi Dini Karsinoma Sel Basal. Indonesian Journal of Cancer. 10 (2) : 61-66.
- [5] Meyer, Laughlin, Ferrigini. 1982. "Brine Shrimp: Convenient General Bioassay for Active Constituent". Planta Medica 45: 31 – 34.
- [6] Colegate, S. M. and Molyneux, R. J. 1993. Bioactive Natural Products Detection : Isolation and Structural Determination. CRC Press, Inc. Boca Raton Florida. pp : 444-454.
- [7] Susanti, F.E., P. Sugita., And L. Ambasari. 2016. Purification OfActive Compounds From Kecapi Leaves That Have Potential As Anticancer For In Vitro On Murine Cells Leukemia P-388. *Int. J. Chem. Sci.* 14(3): 1376-1384.