

## UJI TOKSISITAS EKSTRAK DAUN WARU (*Hibiscus tiliaceus* L.) TERHADAP LARVA *Artemia salina* Leach SERTA IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWANYA

Ni Luh Rustini, Komang Ariati, A. A. Indah Purna Dewi, dan I Made Dira Swantara

*Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Bali*

*Email : rustini.niluh@yahoo.co.id*

### ABSTRAK

Uji toksisitas metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) merupakan uji pendahuluan yang digunakan untuk memantau senyawa bioaktif dari bahan alami sebagai antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa toksik dari isolat daun waru (*Hibiscus tiliaceus* L.). Maserasi 900 g serbuk daun waru dengan 7000 mL etanol (5x24 jam) menghasilkan ekstrak pekat etanol sebanyak 53,19 g dengan hasil uji toksisitas terhadap larva *Artemia salina* Leach  $LC_{50}=79,43$  ppm. Ekstrak etanol dipartisi menghasilkan 1,81 g ekstrak n-heksana ( $LC_{50}=63,09$  ppm), 1,52 g ekstrak kloroform ( $LC_{50}=1000$  ppm) dan 50,08 g ekstrak air ( $LC_{50}=316$  ppm). Ekstrak n-heksana bersifat paling toksik selanjutnya dipisahkan, dimurnikan dan diidentifikasi. Pemisahan ekstrak n-heksana secara kromatografi kolom dengan fase diam silika gel 60 dan fase gerak n-heksana-kloroform-etanol (5:4:1) menghasilkan 7 fraksi. Fraksi satu (F1) dengan noda tunggal pada kromatografi lapis tipis bersifat paling toksik ( $LC_{50}=398$  ppm). Identifikasi fraksi satu (F1) dengan uji fitokimia, spektrofotometer UV-Vis dan spektrofotometer IR diduga mengandung senyawa golongan steroid kelompok sterol.

Kata kunci : daun waru, *Hibiscus tiliaceus* L., toksisitas, *Artemia salina* Leach

### ABSTRACT

The “Brine Shrimp Lethality Test” (BSLT) is a preliminary test used to monitor the bioactive compounds from natural products as anti-cancer. This research aimed to determine of toxic compounds in the leaf of waru (*Hibiscus tiliaceus* L.). Maceration of 900 g waru leaf powder with 7000 mL of ethanol (5x24 hours) yielded 53,19 g ethanol extract with toxicity tests to larvae of *Artemia salina* Leach ( $LC_{50}$ ) of 79.43. The ethanol extract was partitioned to yield 1,81 g of n-hexane ( $LC_{50} = 63,09$  ppm), 1,52 g of chloroform ( $LC_{50} = 1000$  ppm) and 50,08 g of aqueous extract ( $LC_{50} = 316$  ppm). The most toxic, n-hexane extract, was then separated, purified and identified. n-hexane extract was separated by column chromatography with silica gel 60 as stationary phase and n-hexane-chloroform-ethanol (5:4:1) as mobile phase to yield 7 fractions. Fraction one (F1) with a single stain on thin-layer chromatography was the most toxic ( $LC_{50} = 398$  ppm). Identification with phytochemical test, UV-Vis spectrophotometer and IR spectrophotometer, showed that the isolate contained sterol compounds.

Keywords : leaf of waru, *Hibiscus tiliaceus* L., toxicity, *Artemia salina* Leach

### PENDAHULUAN

Berbagai macam jenis penyakit kian hari kian bermunculan dengan tingkat keganasan yang berbeda dan cenderung meningkat, salah satunya yaitu penyakit kanker. Penyakit kanker menempati peringkat tertinggi penyebab kematian di dunia, khususnya di Negara berkembang (Anderson *et*

*al.*,2001; Indrayani,2006). Usaha seperti pembedahan, radioterapi dan kemoterapi sitostatik telah dilakukan untuk menanggulangi penyakit ini, namun tidak sedikit usaha tersebut justru menimbulkan efek samping (Moeljopawiro, 2007). Kondisi seperti ini menuntut adanya cara alternatif yang aman untuk pengobatan kanker dengan efek

samping yang dapat diminimalkan seperti penggunaan bahan alami tumbuhan.

Di Bali, penggunaan tumbuhan sebagai obat tradisional telah lama dipercayai. Masyarakat Bali menggunakan tumbuhan sebagai obat berlandaskan pada naskah lontar *usada* (Nala, 1993). Tumbuhan waru merupakan salah satu jenis tumbuhan dalam *Usada Taru Permana* yang mengandung khasiat obat. Tumbuhan waru yang termasuk dalam suku *Malvaceae* dengan marga *Hibiscus* (Lawrence, 1964; Backer dan Backhuizen, 1968) digunakan dalam berbagai pengobatan. Daun waru dapat digunakan untuk mengobati TB paru-paru, batuk, sesak napas, radang amandel (tonsillitis), demam, disentri pada anak, muntah darah, radang usus, bisul, abses, dan rambut rontok (Indah dan darwati, 2013).

Daun waru mengandung senyawa polifenol, saponin dan flavonoid. Akar waru mengandung senyawa tanin, saponin, dan flavonoid (Kumar *et al.*, 2008). Kulit batang waru mengandung senyawa *hibiscusamide*, *N-trans feruloyltiramine*, dan *N-cis feruloyltiramine* dan bersifat toksik pada sel kanker kolon HT-29 dengan  $LC_{50} < 4 \mu\text{g/mL}$  (Chen *et al.*, 2006). Daun waru diduga dapat memiliki aktivitas sebagai antikanker karena secara kemotaksonomi senyawa turunan dapat terdistribusi ke seluruh bagian tumbuhan. Hasil uji toksisitas ekstrak etanol daun waru menghasilkan nilai  $LC_{50}$  79,43 ppm, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dalam proses pencarian komponen bioaktif yang berpotensi sebagai antikanker.

## MATERI DAN METODE

### Bahan

Bahan yang digunakan yaitu daun waru (*Hibiscus tiliaceus* L.) dengan bioindikator untuk uji toksisitas yaitu larva *Artemia salina* Leach, etanol, kloroform, n-heksana, silika gel GF<sub>254</sub>, silika gel 60, tween 80, aquades, air laut dengan salinitas 32,3882 g/1000mL, HCl pekat, FeCl<sub>3</sub>, pereaksi willstater, pereaksi Bate Smith-Metacalfe, pereaksi Meyer, pereaksi Wagner, pereaksi Dragendroff dan pereaksi Liberman-Bruchard.

### Peralatan

Alat yang digunakan yaitu seperangkat alat gelas, pisau, blender, penguap putar vakum (*vacuum rotary evaporator*) BUCHI Vacum Pump V-700, neraca analitik, bak kaca, batang pengaduk, pipet volume, pipet tetes, pipet mikro, kertas saring, alumunium foil, corong pisah, seperangkat alat KLT, seperangkat alat kromatografi kolom, spektrofotometer UV-Vis double beam shimadzu/UV 1800 dan spektrofotometer IR shimadzu/IR Prestige-21.

### Cara Kerja

Serbuk daun waru (900 g) dimaserasi dengan etanol hingga diperoleh ekstrak pekat etanol dan diuji toksisitasnya. Ekstrak etanol dilarutkan pada campuran etanol:air (7:3) kemudian di fraksionasi (partisi) dengan pelarut n-heksana dan kloroform, sehingga diperoleh tiga ekstrak pekat (ekstrak pekat n-heksana, kloroform, dan air). Ketiga ekstrak kemudian diuji toksisitasnya dan ekstrak yang paling toksik dilanjutkan pada tahap pemisahan dan pemurnian.

Ekstrak paling toksik dipisahkan dengan kromatografi kolom dengan fase diam silika gel 60 dan fase gerak n-heksana-kloroform-etanol (5:4:1) menghasilkan beberapa kelompok fraksi. Fraksi dengan pola pemisahan yang sama diuji toksisitasnya dan isolat paling toksik diidentifikasi menggunakan uji fitokimia, spektrofotometer IR, dan spektrofotometer UV-Vis.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Ekstraksi

Hasil ekstraksi 900 g serbuk daun waru dengan 7000 mL etanol (3x24 jam) diperoleh ekstrak pekat etanol sebanyak 53,19 g dengan nilai  $LC_{50}$  sebesar 79,43 ppm. Fraksionasi terhadap 53,19 g ekstrak pekat etanol menghasilkan 1,81 g ekstrak n-heksana, 1,52 g ekstrak kloroform dan 50,08 g ekstrak air. Hasil uji toksisitas seperti pada Tabel 1 menunjukkan ekstrak n-heksana bersifat paling toksik sehingga dilanjutkan pada proses pemisahan dan pemurnian.

Tabel 1. Hasil uji toksisitas fraksi n-heksana, kloroform dan air terhadap larva *Artemia salina* Leach

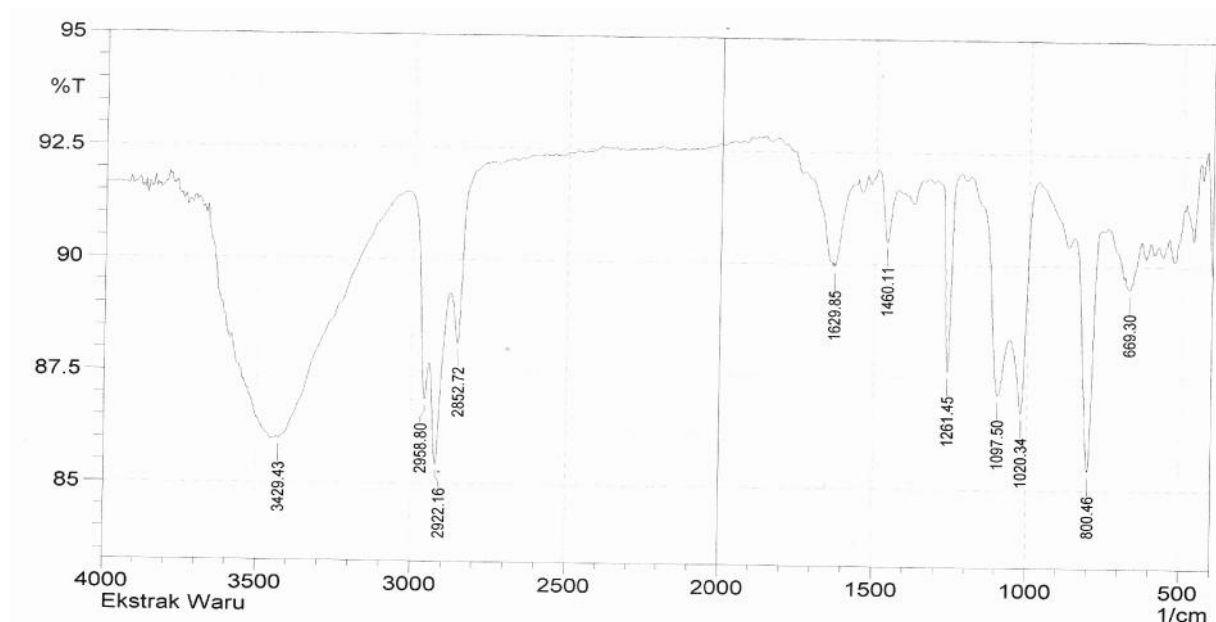
Fraksi	Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva yang mati			% Mortalitas	LC <sub>50</sub> (ppm)
		1	2	3		
Ekstrak pekat n-heksana	0	0	0	0	0	63,09
	10	2	2	3	13,72	
	100	4	4	5	48,79	
	1000	9	9	8	92,01	
Ekstrak pekat kloroform	0	0	0	0	0	1000
	10	1	2	2	7,78	
	100	3	2	3	24,95	
	1000	5	4	4	54,02	
Ekstrak pekat air	0	0	0	0	0	316
	10	2	2	2	9,38	
	100	4	3	3	32,01	
	1000	5	6	5	65,01	

Tabel 2. Hasil uji toksisitas fraksi F1-F7 terhadap larva *Artemia salina* Leach

Fraksi	Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva yang mati			% Mortalitas	LC <sub>50</sub> (ppm)
		1	2	3		
F1	0	0	0	0	0	398
	10	2	1	2	7,44	
	100	3	3	4	28,82	
	1000	5	4	5	65,29	
F2	0	0	0	0	0	63095
	10	1	0	0	1,27	
	100	2	1	1	9,40	
	1000	3	2	3	35,24	
F3	0	0	0	0	0	7,9x10 <sup>25</sup>
	10	0	0	0	0	
	100	0	0	0	0	
	1000	0	1	1	6,60	
F4	0	0	0	0	0	199526
	10	0	0	1	1,23	
	100	1	1	1	7,39	
	1000	2	3	2	32,33	
F5	0	0	0	0	0	39810717055
	10	0	0	0	0	
	100	0	1	0	1,76	
	1000	1	1	2	16,08	
F6	0	0	0	0	0	63095734,448
	10	0	0	0	0	
	100	0	1	1	3,60	
	1000	1	2	2	21,78	
F7	0	0	0	0	0	7,9x10 <sup>25</sup>
	10	0	0	0	0	
	100	0	0	0	0	
	1000	0	1	1	6,60	

Tabel 3. Hasil uji fitokimia

No	Uji fitokimia untuk senyawa	Pereaksi	Perubahan warna	Kesimpulan
1	Flavonoid	NaOH 10%	Tidak ada perubahan	-
		Wilstater	Tidak ada perubahan	-
		Bate Smith-Metacalfe	Tidak ada perubahan	-
2	Saponin	Air panas (dikocok)	Tidak ada busa	-
3	Fenolik	FeCl <sub>3</sub>	Tidak ada perubahan	-
4	Alkaloid	Dragendorff	Tidak ada endapan	-
		Meyer	Tidak ada endapan	-
		Wagner	Tidak ada endapan	-
5	Steroid/triterpenoid	Lieberman-Burchard	Biru kehijauan	+ (steroid)



Gambar 1. Spektrum Inframerah Fraksi F1

### Pemisahan dan Pemurnian

Hasil pemisahan 1,5 g ekstrak n-heksana menghasilkan tujuh kelompok fraksi (F1-F7) seperti pada Tabel 2 dan hanya fraksi F1 dengan noda tunggal bersifat toksik dengan nilai LC<sub>50</sub> 398 ppm.

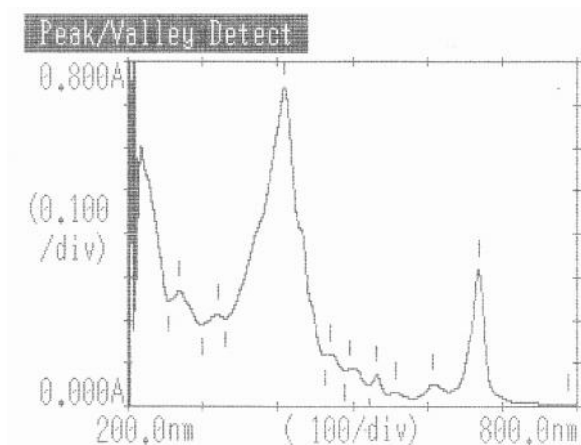
### Identifikasi

Isolat F1 selanjutnya diuji fitokimia, dan diidentifikasi dengan spektrofotometer IR dan spektrofotometer UV-Vis. Hasil uji fitokimia seperti pada Tabel 3 menunjukkan isolat mengandung senyawa steroid.

Hasil analisis isolat dengan spektrofotometer IR (Gambar 1) menunjukkan

serapan melebar pada daerah bilangan gelombang 3429,43cm<sup>-1</sup> diduga adalah vibrasi ulur gugus OH berikatan hidrogen yang berasal dari alkohol. Dugaan ini diperkuat dengan adanya serapan pada daerah sidik jari bilangan gelombang 1020,34 cm<sup>-1</sup> dan 1097,50 cm<sup>-1</sup> karena vibrasi tekuk dari C-O alkohol. Serapan pada daerah 2958,80 cm<sup>-1</sup>, 2922,16 cm<sup>-1</sup> dan 2922,16 cm<sup>-1</sup> diduga disebabkan oleh vibrasi ulur dari C-H alifatik, yang diperkuat dengan munculnya serapan pada daerah sidik jari bilangan gelombang 1460,11 cm<sup>-1</sup> dan 1261,45 cm<sup>-1</sup> serta serapan kuat pada 800,46 karena vibrasi tekuk C-H alifatik keluar bidang dari cincin yang bukan aromatis. Serapan pada daerah 1629,85 cm<sup>-1</sup> merupakan vibrasi ulur dari gugus C=C yang tidak

terkonjugasi, didukung dengan munculnya serapan pada daerah sidik jari  $900\text{ cm}^{-1}$  karena vibrasi tekuk dari C-H ikatan rangkap pada cincin (Silverstain *et al.*, 1981; Goad and Akihisa, 1997). Hasil identifikasi dengan spektrofotometer inframerah ini menunjukkan bahwa isolat kemungkinan mengandung gugus fungsi O-H, C-H alifatik, serta C=C alifatik yang tidak terkonjugasi, dan gugus fungsi ini juga dimiliki oleh senyawa golongan steroid kelompok sterol. Jadi, isolat daun waru kemungkinan mengandung senyawa golongan steroid kelompok sterol.



Gambar 2. Spektrum UV-Vis Fraksi F1

Hasil analisis isolat dengan spektrofotometer UV-Vis (Gambar 2) menghasilkan tiga serapan utama yang muncul pada panjang gelombang 269; 409 dan 669 nm. Serapan yang terjadi pada panjang gelombang 269 nm kemungkinan disebabkan oleh terjadinya transisi elektronik  $\pi \rightarrow \pi^*$  yang diduga serapan dari C-H. Serapan pada panjang gelombang 409 nm kemungkinan disebabkan terjadinya transisi elektronik  $\pi \rightarrow \pi^*$  yang diduga dari suatu kromofor C=C. Serapan pada panjang gelombang 669 nm kemungkinan disebabkan terjadinya transisi elektronik  $n \rightarrow \pi^*$  yang diduga dari suatu aoksokrom O-H yang mempunyai elektron non bonding. (Silverstain *et al.*, 1981; Sastrohamidjojo, 1991; Gandjar dan Rohman, 2012).

## SIMPULAN DAN SARAN

### Simpulan

Isolat F1 daun waru berifat toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan nilai  $LC_{50}$  sebesar 398 ppm. Hasil identifikasi dengan uji fitokimia, spektrofotometer IR dan spektrofotometer UV-Vis, isolat daun waru mengandung senyawa golongan steroid kelompok sterol dengan kemungkinan gugus fungsi O-H, C-H alifatik, serta C=C alifatik yang tidak terkonjugasi.

### Saran

Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk mengetahui struktur dan letak gugus-gugus fungsi dari senyawa steroid kelompok sterol tersebut dengan menggunakan spektrofotometer NMR  $^1\text{H}$ , NMR  $^{13}\text{C}$ , spektrofotometer massa serta penelitian lebih lanjut tentang bioaktivitas lanjutan senyawa-senyawa antikanker.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini, penulis menyampaikan terimakasih banyak kepada semua pihak yang turut serta membantu dalam proses penyelesaian penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, J.E., Goetz, C.M., McLaughlin, J.L., and Suffness, M., 1991, A Blind Comparison of Simple Bench-top Bioassays and Human Tumour Cell Cytotoxicities as Antitumor Prescreens, *Phytochem Analysis*, (2): 107-111
- Backer, T.C.A. and R.C. Bakhuizen Van Den Brink, 1968, *Flora of Java I, III*, Wolters-Noordhoff N. V. Groningen, The Netherlands
- Chen, J.J., Huang SY, Duh CY, Chen IS, Wang TC, and Fang HY, 2006, A new cytotoxic Amide from the stem wood of *Hibiscus tiliaceus*, *Planta Med*, 72 (10) : 935-938
- Gandjar, I. G. dan Rohman, A., 2012, *Analisis Obat secara Spektrofotometri dan*

- Kromatografi*, cetakan I, Pustaka Pelajar, Yogyakarta
- Goad, L.J. and Akihisa, T., 1997, *Analysis Of Sterols*, First edition, Blackie Academic & Professional, an imprint of Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London SE1 8HN, UK
- Indah S.Y. dan Darwati, 2013, *Keajaiban Daun Tumpas Tuntas Penyakit Kanker, Diabetes, Ginjal, Hepatitis, Kolesterol, Jantung*, Graha Pustaka, Jakarta, h. 60
- Indrayani, L., S. Hartati, dan S. Lydia, 2006, Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach, *Berkas Penelitian Hayati*, (12): 57-61
- Kumar, S., Kumar, D., and Prakash, O., 2008, Evaluation of Antioxidant Potential, Phenolic and Flavanoid Contents of Hibiscus tiliaceus Flowers, *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and food Chemistry*, 7 (4) : 2863-2871
- Lawrence, G.H.M., 1964, *Taxonomy of Vascular Plants*, The Macmillan Company, New York
- Moeljopawiro, S., M. R. Anggelia. D, Ayuningtyas, B., Widaryanti, Y., Sari, dan I. M. Budi, 2007, Pengaruh Sari Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam.) Terhadap Pertumbuhan Sel Kanker Payudara dan Sel kanker Usus Besar, *Berkala Ilmiah Biologi*, 6 (2) : 121-130
- Nala, N., 1993, *Usada Bali*, PT. Upada Sastra, Denpasar