

**ISOLASI SENYAWA SITOTOKSIK DARI DAUN ANDONG**  
(*Cordyline terminalis* Kunth)

**N. W. Bogoriani, Sri Rahayu Santi, dan I. A. R. Astiti Asih**

*Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaranr*

**ABSTRAK**

Telah dilakukan isolasi dan identifikasi salah satu senyawa dari fraksi aktif sitotoksik pada daun Andong (*Cordyline terminalis* Kunth) dengan  $LC_{50}$  sebesar 41,64 ppm dan positif senyawa saponin. Diperoleh isolat sebanyak 7,5 mg yang berupa padatan amorf berwarna putih melalui beberapa tahap pemisahan secara kromatografi (kromatografi kolom gravitasi dan kromatografi cair kinerja tinggi preparatif). Identifikasi isolat menggunakan spektrometri massa dengan “electrospray positive” pola-pola fragmentasinya menunjukkan bahwa senyawa isolat mempunyai berat molekul 866 dari hasil perhitungan puncak-puncak ion pada  $m/z$  889[M + Na]<sup>+</sup> dan 867[M + H]<sup>+</sup>. Puncak-puncak ion isolat pada  $m/z$  721 [(M + H) - 146]<sup>+</sup>, 703 [(M + H) - 164]<sup>+</sup>, 575 [(M + H) - 292]<sup>+</sup>, 557 [(M + H) - 310]<sup>+</sup>, 429 [(M + H) - 438]<sup>+</sup>, dan 411 [(M + H) - 456]<sup>+</sup>, dari penggalan fragmen-fragmennya menunjukkan bahwa molekul isolat mengikat tiga gula (dua gula terminal dan satu gula sentral) yang berasal dari bagian metilpentosa dengan berat molekul masing-masing adalah 164 yang terikat pada aglikon yang mempunyai berat molekul 428. Spektrum resonansi magnet proton dari isolat dalam piridin- $d_5$  menunjukkan adanya sinyal-sinyal proton yang karakteristik dari tiga gugus metil steroid (dua metil angular dan satu metil sekunder) pada  $\delta$  1,37 (s), 0,84 (s) dan 1,02 (d,  $J = 6,6$  Hz), sebuah gugus eksometilen pada  $\delta$  4,79 ppm dan 4,71 (masing-masing br s), sebuah gugus etilen pada  $\delta$  5,52 ppm (br d,  $J = 5,4$  Hz) dan muncul sinyal-sinyal proton yang terikat pada atom karbon nomor 26 pada  $\delta$  4,01 dan 4,44 ppm (masing-masing d,  $J = 12,0$  Hz) serta ada tiga sinyal dari proton anomerik pada  $\delta$  6,43 ppm (br s), 5,56 ppm (br s) dan 4,57 ppm (d,  $J = 7,0$  Hz). Semua data di atas mengindikasikan bahwa senyawa isolate tersebut merupakan senyawa saponin steroid spirostan.

Kata kunci: isolasi, identifikasi, *Artemia salina* Leach, *Cordyline terminalis* Kunth, Liliaceae

**ABSTRACT**

Isolation and identification one of cytotoxic fraction have been conducted from the leaves of Andong (*Cordyline terminalis* Kunth). The fraction having  $LC_{50}$  values of 41,64 ppm contains saponin. Major isolate (7.5 mg white amorphous solid) was obtained after a series of chromatographic separations (gravity column chromatography, and preparative high performance liquid chromatography). Identification of the isolate using mass spectrometry with positive electrospray showed MW of 866 as calculated from the ion peaks  $m/z$  889[M + Na]<sup>+</sup>, and 867[M + H]<sup>+</sup>. The ion peaks at  $m/z$  721[(M + H) - 146]<sup>+</sup>, 703[(M + H) - 164]<sup>+</sup>, 575[(M + H) - 292]<sup>+</sup>, 557[(M + H) - 310]<sup>+</sup>, 429[(M + H) - 438]<sup>+</sup>, and 411 [(M + H) - 456]<sup>+</sup> of its fragments indicate the presence of three sugars (two terminal sugars and one central sugar) from methylpentose moiety with MW 164 each linked to an aglycone of MW of 428. Proton magnetic resonance spectrum of the isolate in pyridine- $d_5$  showed characteristic proton signals for three steroid methyls (two angular methyls and one secondary methyl) at  $\delta$  1.37 (s), 0.84 (s) and 1.02 (d,  $J = 6.6$  Hz); an exomethylene group at  $\delta$  4.79 ppm and 4.71 (each br s); an ethylene group at  $\delta$  5.52 ppm (br d,  $J = 5.4$  Hz); signals of the protons linked to C<sub>26</sub> at  $\delta$  4.01 and 4.44 ppm (each d,  $J = 12.0$  Hz), and three anomeric protons at  $\delta$  6.43 ppm (br s); 5.56 ppm (br s) and 4.57 ppm (d,  $J = 7.0$  Hz). From the above data it can be indicated that the isolate resulted is spirostan steroidal saponin.

Keywords: isolation, identification, *Artemia salina* Leach, *Cordyline terminalis* Kunth, Liliaceae

## PENDAHULUAN

Penyakit kanker merupakan salah satu ancaman yang utama terhadap kesehatan. Meskipun usaha pengobatan kanker secara intensif telah dilakukan namun hingga saat ini belum diketemukan obat yang dapat mengatasi penyakit tersebut secara memuaskan. Hal ini disebabkan terutama karena rendahnya selektivitas obat-obatan antikanker yang digunakan ataupun karena patogenis kanker itu sendiri belum jelas benar. Masyarakat Indonesia telah mengenal berbagai macam ramuan tradisional yang digunakan sebagai obat antikanker. Di lain pihak para peneliti berusaha mencari senyawa antikanker dari keanekaragaman hayati yang tersedia di Indonesia baik berdasarkan penggunaannya secara tradisional maupun dengan pendekatan secara kemotaksonomi.

Salah satu tumbuhan yang banyak digunakan sebagai obat tradisional adalah tumbuhan andong (*Cordyline terminalis* Kunth) Daun tumbuhan andong banyak sekali digunakan sebagai obat sakit kepala, diare, disentri, TBC paru, asma, sakit kulit, inflamasi mata, sakit punggung, rematik, dan encok (Farnsworth, 1966; Griffin and Maunwongyanthi, 1969; Nguyen and Do, 1991; Wahyuni, 1985; Wijayakusuma, 1994).

Dari famili Liliaceae ditemukan beberapa glikosida steroid yang mempunyai aktivitas biologi sebagai antitumor dan menunjukkan aktivitas sitotoksik yang sangat kuat terhadap sel tumor pada manusia. Di samping itu juga ditemukan beberapa senyawa steroid yang mempunyai aktivitas sebagai promotor antitumor secara in vitro (Mimaki and Sashida, 1996; Mimaki and Sashida, 1996). Menurut Koji Nakanishi (1974), tumbuhan dengan famili yang sama kemungkinan mempunyai aktivitas dengan struktur senyawa yang mirip.

Berdasarkan latar belakang di atas, maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui golongan senyawa sitotoksik yang terkandung dalam daun andong dengan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), yang menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach sebagai bioindikator.

## MATERI DAN METODE

### Bahan

Bahan kimia yang digunakan terdiri atas berbagai jenis pelarut organik teknis dan pro analisis (p.a), larutan asam sulfat 10% dalam etanol, pereaksi Liebermann-Burchard (asam sulfat pekat + asetat anhidrida), silika gel 60 F<sub>254</sub> untuk kromatografi lapis tipis dan silika gel 60 (70-230 mesh) untuk kromatografi kolom gravitasi, dan larva udang *Artemia salina* Leach.

### Peralatan

Peralatan yang digunakan terdiri atas berbagai alat gelas yang biasa digunakan di Laboratorium Kimia Organik, neraca analitik, pengisap gasing hampa Buchi R-114 yang dilengkapi dengan sistem vakum Buchi B-169 dan berbagai instrumentasi analisis seperti spektrometri resonansi magnet proton (RMI-<sup>1</sup>H), dan spektrometri massa (MS).

### Prosedur Kerja

Bahan tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun muda andong yang diambil di daerah Tampaksiring Bali. Selanjutnya kira-kira 3 Kg daun andong yang muda dan segar dikumpulkan, dibersihkan dan dipotong-potong halus, kemudian dikeringkan. Bahan yang telah kering diblender dengan ukuran 100 mesh. Selanjutnya serbuk kering daun tumbuhan tersebut ditentukan kadar airnya.

Kira-kira 0,5 Kg serbuk kering daun andong diekstraksi dengan cara maserasi

selama 24 jam menggunakan pelarut metanol dengan cara berulang-ulang sampai terekstraksi habis, kemudian diuapkan. Ekstrak kental tersebut diuji hayati dengan larva udang *Artemia salina* Leach dan uji fitokimia.

Ekstrak kental metanol dilarutkan dalam air, kemudian dipartisi berturut-turut dengan n-heksana, kloroform, dan n-butanol, lalu masing-masing fraksi diuapkan. Masing-masing fraksi kental tersebut diuji hayati. Fraksi yang paling toksik kemudian dimurnikan dengan kromatografi lapis tipis, kromatografi kolom, dan kromatografi cair kinerja tinggi.

Ekstrak kental diuji toksisitasnya dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach. Uji sitotoksiknya dilakukan dengan cara sebagai berikut :

Dibuat media *Brine Shirimp* dengan menyaring air laut secukupnya. Medium tersebut selanjutnya dimasukkan dalam aquarium yang memiliki sekat berlubang. Satu bagian dibuat gelap dan satu bagian dibuat terang. Telur *Artemia salina* L. diletakkan secukupnya pada tempat yang memiliki penerangan yang cukup selama 48 jam sehingga telur tersebut menetas dan siap digunakan untuk pengujian. Disiapkan vial untuk pengujian, masing-masing sampel disiapkan sembilan vial dan satu kontrol. Ditimbang fraksi yang telah kering sebanyak 20 mg dan dimasukkan ke dalam beker gelas, dilarutkan dengan 2 mL pelarutnya. Dari larutan dipipet sebanyak 500  $\mu$ L, 50  $\mu$ L, 5  $\mu$ L dan masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan pelarutnya diuapkan selama 24 jam. Ke dalam masing-masing tabung reaksi dimasukkan air laut, 50  $\mu$ L DMSO, 10 ekor larva udang, dan setetes larutan ragi, kemudian ditambah air laut sampai volumenya 5 mL sehingga konsentrasinya berturut-turut 1000 ppm, 100 ppm, dan 10

ppm. Dilakukan pengamatan setelah 24 jam terhadap kematian larva udang.

Dilakukan analisis data untuk mencari konsentrasi kematian ( $LC_{50}$ ). Metode penapisan saponin dan steroid mengikuti metode yang dikembangkan oleh Webb (Lajis, 1985).

Setelah proses pemisahan dan pemurnian terhadap isolat murni yang paling toksik dilakukan elusidasi struktur dengan teknik spektrometri dan perbandingan beberapa literatur (Mimaki *et al.*, 1997; Mimaki *et al.*, 1998; Agrawal, 1992; Burger *et al.*, 1998; Hostettmann and Marston, 1995; Silverstein *et al.*, 1991).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Ekstraksi

Sebanyak 0,5 Kg serbuk kering daun andong diekstraksi dengan teknik maserasi, berkali-kali menggunakan pelarut metanol. Proses ekstraksi dengan pelarut ini dilakukan untuk memisahkan semua komponen baik polar maupun non polar dari cuplikan. Berat ekstrak kental pada metanol adalah 85 g. Penapisan fitokimia terhadap ekstrak metanol kental menunjukkan bahwa daun andong mengandung saponin dan steroid, serta berpotensi mengandung senyawa sitotoksik.

Uji sitotoksik menunjukkan ekstrak tersebut mempunyai nilai  $LC_{50}$  kurang dari 1000 ppm yaitu 61,09 ppm, sehingga dapat dikatakan bahwa ekstrak metanol daun andong mempunyai potensi sebagai antitumor.

### Fraksinasi

Ekstrak metanol kental seberat 60 g kemudian dipartisi antara air dan berturut-turut dengan n-heksana, kloroform, dan n-butanol, kemudian masing-masing fraksi dipisahkan dan dipekatkan sehingga diperoleh fraksi air, n-heksana, kloroform,

dan n-butanol. Diperoleh fraksi kental n-heksana 12,41 g berwarna hijau kehitaman ( $LC_{50}$  124 ppm), kloroform 10,75 g berwarna hijau tua ( $LC_{50}$  509,85 ppm), n-butanol seberat 11,10 g kuning kecoklatan ( $LC_{50}$  87,68 ppm) dan air 5,34 g kuning kecoklatan ( $LC_{50}$  954 ppm)

Uji sitotoksik masing-masing ekstrak menunjukkan bahwa ekstrak n-butanol memiliki nilai  $LC_{50}$  yang paling aktif yaitu 87,68 ppm, karena kemungkinan fraksi yang lebih toksik akan mempunyai daya hambat yang lebih tinggi terhadap pertumbuhan kanker, tetapi terjadi penurunan nilai dari  $LC_{50}$  pada ekstrak n-butanol dari ekstrak metanol, ini diduga adanya efek sinergis dari beberapa senyawa dalam metanol.

### Pemisahan dan Pemurnian

Fraksi n-butanol yang paling aktif kemudian dipisahkan dengan cara kromatografi kolom gravitasi dan kromatografi cair kinerja tinggi. Fraksi n-butanol total (3 g) dipisahkan dengan menggunakan fase diam silika gel 60 (70-230 mesh) dan fase gerak kloroform-metanol-air (3:1:0,1) dan penampak noda asam sulfat 10%. Hasil kromatografi kolom gravitasi adalah 50 fraksi (tiap fraksi 3 mL). Pemisahan dengan kromatografi lapis tipis dengan kloroform-metanol-air (3:1:0,1) eluat ini menghasilkan tiga kelompok fraksi.

Fraksi yang paling sitotoksik dengan  $LC_{50}$  sebesar 41,64 ppm (fraksi B) telah menunjukkan satu noda melalui uji kemurnian dengan KLT menggunakan berbagai eluen. Dari hasil uji busa dan steroid menunjukkan bahwa fraksi B positif saponin steroid.

Analisis fraksi B dilanjutkan dengan KCKT dengan kolom YMC ODS-AQ 5  $\mu$ m 120 A° 250 x 4,6 mm, fase gerak campuran asetonitril-air-asam asetat (50:50:0,05), menunjukkan ada lima puncak yang kemudian dipisahkan dan dimurnikan. Komponen yang dipisahkan menghasilkan

isolat berturut-turut 4,8 mg; 1,4 mg; 4,0 mg; 7,5 mg dan 4,8 mg. Isolat major (7,5 mg) berupa serbuk putih yang diteruskan untuk analisis dengan spektrometri massa dan resonansi magnet proton (RMI- $^1$ H).

### Data Spektrometri Massa (MS)

Dari perhitungan ion puncak pada  $m/z$  889  $[M + Na]^+$  dan 867  $[M + H]^+$  pada spektrum massa terlihat bahwa isolat CT-3 mempunyai berat molekul 866. Berdasarkan data spektrum spektrometri massa isolat tersebut memiliki harga  $m/z$  889  $[M + Na]^+$ , 867  $[M + H]^+$  dan data hasil penggalan fragmen-fragmennya pada harga  $m/z$  721  $[(M + H) - 146]^+$ , 703  $[(M + H) - 164]^+$ , 575  $[(M + H) - 292]^+$ , 557  $[(M + H) - 310]^+$ , 429  $[(M + H) - 438]^+$ , dan 411  $[(M + H) - 456]^+$  menunjukkan bahwa molekul isolat mengikat tiga gula (kemungkinan dua gula terminal dan satu gula sentral) yang berasal dari metilpentosa dengan berat molekul masing-masing gula adalah 164 yang terikat pada aglikon yang mempunyai berat molekul 428.

### Data Spektrometri Resonansi Magnet Proton (RMI- $^1$ H)

Spektrum resonansi magnet proton dalam pelarut  $C_5D_5N$  (300 MHz) menunjukkan adanya sinyal-sinyal proton dari tiga gugus metil steroid pada :  $\delta$  1,37 ppm (3H, s, 19-H), 1,02 ppm (3H, d,  $J = 6,6$  Hz, 21-H), dan  $\delta$  0,84 ppm (3H, s, 18-H), sebuah gugus eksometilen pada  $\delta$  4,79 ppm dan 4,71 (masing-masing 1H, br s, 27-H<sub>2</sub>), sebuah gugus etilen pada  $\delta$  5,52 ppm (1H, br d,  $J = 5,4$  Hz, 6-H) dan muncul sinyal-sinyal proton yang terikat pada atom C<sub>26</sub> pada  $\delta$  4,01 dan 4,44 ppm (masing-masing 1H, d,  $J = 12,0$  Hz, 26-H<sub>2</sub>) serta tiga sinyal dari proton anomerik pada  $\delta$  6,43 ppm (1H, br s, 1-H), 5,56 ppm (1H, br s, 1-H), dan 4,57 ppm (1H, d,  $J = 7,0$  Hz, 1-H) ini memperkuat dugaan bahwa senyawa isolat

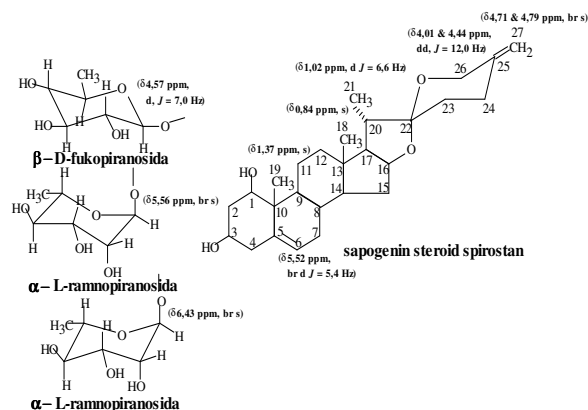
merupakan saponin steroid turunan spirostan dengan mengikat tiga gula (diduga dua gula ramnosa dan satu gula fruktosa) dan mempunyai tiga orientasi ikatan glikosidik (dua orientasi ikatan dua  $\alpha$ -L-ramnopiranosida dan satu  $\beta$ -D-fukopiranosida yang terjadi baik secara antar glikon maupun antara glikon dan sapogenin).

## SIMPULAN DAN SARAN

### Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh dapat diambil simpulan sebagai berikut :

1. Isolat sitotoksik ( $LC_{50} = 41,64$ ) dari daun andong (*Cordyline terminalis* Kunth) termasuk golongan saponin steroid.
2. Salah satu golongan senyawa saponin steroid yang dipisahkan berupa padatan amorf berwarna putih dan mempunyai  $m/z$  889  $[M + Na]^+$  dan 867  $[M + H]^+$ .
3. Bagian gula dari saponin menunjukkan adanya tiga gula yang menyusun glikonnya. Pelepasan fragmen 146, 164, 292, dan 310 menunjukkan ada dua gula terminal dan satu gula sentral berasal dari metilpentosa. Berdasarkan harga tetapan gandengan proton anomerik ketiga gula menunjukkan adanya tiga orientasi ikatan yaitu : dua  $\alpha$ -L-ramnopiranosida dan satu  $\beta$ -D-fukopiranosida yang terjadi baik secara antar glikon maupun antara glikon dan sapogenin.
4. Diperoleh struktur dari sapogenin steroid spirostan dan tiga gula yang menyusun glikonnya (dua  $\alpha$ -L-ramnopiranosida dan satu  $\beta$ -D-fukopiranosida)



Gambar 1. Saponin steroid spirostan

### Saran

Dari hasil penelitian yang diperoleh, maka dapat disarankan

1. Perlu dilakukan uji sitotoksik terhadap masing-masing senyawa murni yang diperoleh dengan larva udang *Artemia salina* Leach dan juga uji langsung dengan sel kanker.
2. Untuk menentukan struktur saponin steroid dari daun andong (*Cordyline terminalis* Kunth) secara lengkap perlu dilakukan pengukuran spektrometri resonansi magnet inti dua dimensi.
3. Untuk mengetahui jenis gula yang menyusun glikonnya harus dilakukan teknik hidrolisis terhadap isolat. Perlu dilakukan teknik sintesis dan “modeling” komputer untuk menetapkan struktur usulan sebagai struktur absolut.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Lembaga Penelitian Universitas Udayana atas bantuan dana untuk penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- Agrawal, P.K., 1992, NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides, *Phytochemistry*, 3, 3307-3330.
- Burger, I., Burger, B. V., Albrecht, C.F., Spies, H.S.C. and Sandor, P., 1998, Triterpenoid saponins from *Becium grandiflorum* var. *obovatum*, *Phytochemistry*, 49, 2087-2095.
- Farnsworth, N.R., 1966, Biological and phytochemical screening of plants, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55 (3), 257-260.
- Griffin, W. J., and Maunwongyanthi, P., 1969, A comparison of four species of *Cordyline*. *Planta Medica*, 17, 346-360.
- Hostettmann, K. and Marston, A., 1995, *Chemistry and Pharmacology of natural products: saponins*, Cambridge University Press, London
- Lajis, N. Hj., 1985, The phytochemical survey, *Proceedings of a workshop*, Department of Chemistry, Universiti Pertanian Malaysia, Serdang Selangor, Malaysia, 138-139.
- Mimaki, Y. and Sashida, Y., 1996, Steroidal Glikosida from the Liliaceae Plants and their Biological Activities, *Saponins Used Traditional and Modern Medicine*, 207-208.
- Mimaki, Y. and Sashida, Y., 1996, Steroidal saponis from the Liliaceae Plants and their Biological Activities, *Saponins Used Traditional and Modern Medicine*, 101-109.
- Mimaki, Y., Kuroda, M., Takaashi, Y., and Sashida, Y., 1997, Steroidal glucosides from leaves of *Cordyline stricta*, *Phytochemistry*, 45(6), 1229-1234.
- Mimaki, Y., Kuroda, M., Takaashi, Y., and Sashida, Y., 1998, Steroidal saponis from the leaves of *Cordyline stricta*, *Phytochemistry*, 47(1), 79-85.
- Nakanishi, K., 1974, *Natural Products Chemistry*, Vol 1, Kodansha Scientific, Tokyo.
- Nguyen, X. D. and Do, T. L., 1991, Selection of traditional medicines for study, *Journal of Ethnopharmacology*, 32, 57-70.
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C., and Morrill, T.C., 1991, *Spectroscopic Identification of Organic Coumpound*, John Wiley & Sons, Inc, New York.
- Wahyuni, T. , 1985, *Belajar ilmu ketabiban*, Penerbit Mekar, Surabaya, 52-53.
- Wijayakusuma, H., 1994, *Tanaman Berkhasiat Obat di Indonesia*, Penerbit Kartini, Jakarta