

PENAPISAN FITOKIMIA DAN UJI TOKSISITAS DARI DAUN *Myristica fatua* HOUTT

Sofa Fajriah^{1,2*} & Megawati¹

¹Pusat Penelitian Kimia, LIPI, Kawasan PUSPIPTEK Serpong

²Departemen Kimia, FMIPA, UI, Depok

*Alamat korespondensi : sofafajriah@gmail.com

Abstrak : *Myristica fatua* merupakan salah satu tumbuhan obat asli Indonesia yang berpotensi untuk dikembangkan. Telah dilakukan penapisan fitokimia dan uji toksisitas menggunakan metode BSLT (Brine Shrimp Lethality Toxicity) terhadap ekstrak metanol, ekstrak aseton dan etanol 70%. Selanjutnya ekstrak metanol difraksinasi untuk memperoleh fraksi n-heksana, etil asetat, dan n-butanol dari daun *Myristica fatua* Houtt dan dilakukan uji toksisitas lebih lanjut. Hasil penapisan fitokimia menunjukkan bahwa daun *M. fatua* mengandung senyawa terpenoid, steroid, flavonoid, saponin, dan tanin. Potensi antikanker juga ditunjukkan terhadap ekstrak metanol dan fraksi etil asetat yang mempunyai toksisitas paling tinggi dari fraksi lainnya dengan LC50 masing-masing adalah sebesar 64,57 dan 83,75 µg/mL.

Kata kunci : *Myristica fatua* Houtt, penapisan fitokimia, toksisitas, BSLT

Abstract : *Myristica fatua* is one of Indonesian natural origin medicinal plant which has potentiality to be developed. Phytochemical screening and toxicity assay of methanol, acetone and 70% ethanol extracts have been done using BSLT (Brine Shrimp Lethality Toxicity) method. Furthermore, the methanol extract was fractionated to obtain n-hexane, ethyl acetate and n-butanol fractions from the leaves of *Myristica fatua* Houtt and further evaluated their toxicity. Phytochemical screening results showed that leaves of *M. fatua* contain terpenoid, steroid, flavonoid, saponin and tannin compounds. Methanol and ethyl acetate extract showed promising result for anticancer with highest toxicity among the others fractions with LC50 64.57 and 83.75 µg / mL respectively.

Keywords: *Myristica fatua* Houtt, phytochemical screening, toxicity, BSLT

PENDAHULUAN

Myristicaceae merupakan salah satu suku pantropis. Jenis yang tergolong anggota suku ini umumnya berupa pohon dan berumah dua. Distribusi jenis yang tergolong marga *Myristica* di seluruh dunia terdapat 175 jenis yang telah dikenal dan terutama ditemukan di India, kawasan Malesiana, Australia Utara dan Fiji di wilayah Pasifik Timur, khusus untuk wilayah Indonesia ditemukan 9 jenis. *Myristica fatua* merupakan salah satu dari 9 jenis yang berasal dari Indonesia, khususnya di Maluku (Arrijani, 2005).

Tumbuhan pala hutan (*Myristica fatua* Houtt) merupakan salah satu tanaman endemik dari Maluku dan hampir tidak dikenal secara luas. *M. fatua* secara empirik tidak digunakan sebagai bahan psikoaktif atau rempah seperti halnya pala biasa (*M. fragrans*). Secara empirik buah pala hutan ini sering digunakan sebagai aprodisiak sehingga dikenal juga dengan nama pala jantan. Selain sebagai aprodisiak, tumbuhan ini juga digunakan sebagai bahan bangunan dan minyaknya sebagai minyak lampu (Jamal & Agusta, 2004).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kandungan golongan senyawa tanaman daun *Myristica fatua* dengan metode uji penapisan fitokimia, yang merupakan salah satu pendekatan dalam penelitian tumbuhan obat untuk mendeteksi senyawa tumbuhan berdasarkan golongan. Pengujian

toksisitas dilakukan dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*), yang merupakan metode skrining awal dalam pengamatan toksisitas suatu ekstrak atau senyawa, dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach sebagai obyek pengamatan, yaitu dengan mengamati tingkat kematian larva udang *Artemia salina* Leach terhadap ekstrak dari tanaman.

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

Bahan Tanaman

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun *Myristica fatua* Houtt yang diperoleh dari kawasan Hutan Mekongga pada bulan Maret 2014 dan dideterminasi di Herbarium Bogoriense, Pusat Penelitian Biologi LIPI.

Ekstraksi

Daun kering *M. fatua* sebanyak 20 g dimaserasi dengan berbagai pelarut, yaitu metanol, aseton dan etanol 70% selanjutnya diuji aktivitas toksisitas dengan metode BSLT. Ekstrak yang paling aktif difraksinasi dengan cara ekstraksi cair-cair dan diperoleh fraksi n-heksana, etil asetat, dan n-butanol. Masing-masing ekstrak selanjutnya diuji aktivitas toksisitas dengan metode BSLT. Untuk skrining fiokimia sampel uji yang digunakan adalah ekstrak metanol daun *M. fatua*.

Penapisan fitokimia (Depkes RI, 1989; Lachumy, dkk., 2010)

Alkaloid

Larutan Uji: 500 mg ekstrak ditambahkan 1 ml HCl 2N dan 9 ml air kemudian dipanaskan di penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring sehingga diperoleh filtrat.

a. Pereaksi Bouchardat

Pereaksi: 2 g iodium dan 4 g KI dilarutkan dalam 100,0 ml aquades prosedur: 1 ml filtrat ditambahkan 2 tetes pereaksi bouchardat. Jika terbentuk endapan coklat sampai hitam maka mengandung alkaloid.

b. Pereaksi Mayer

Pereaksi : campuran larutan raksa (II) klorida (1,358 g HgCl₂ dalam 60 ml akudes) dengan larutan kalium iodida (5 g kalium iodida P dalam 10 ml akuades) dicukupkan volumenya dengan akuades hingga 100,0 ml. Prosedur: 1 ml filtrat ditambahkan 2 tetes Pereaksi Mayer. Jika terbentuk endapan menggumpal putih atau kuning yang larut dalam metanol maka positif mengandung alkaloid.

c. Pereaksi Dragendorf

Pereaksi : campuran larutan bismuth nitrat (8 g bismuth nitrat dalam 20 ml asam nitrat) dan larutan iodida (27,2 g kalium iodida dalam 50,0 ml akuades) yang didiamkan hingga memisah sempurna. Larutan jernih diambil dan dicukupkan volumenya dengan akuades hingga 100,0 ml. Prosedur: 1 ml filtrat ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorf, apabila terbentuk endapan jingga coklat maka mengandung alkaloid. Serbuk mengandung alkaloid jika sekurangnya terbentuk endapan dengan dua golongan larutan percobaan yang digunakan.

Terpenoid/Steroid

10 mg ekstrak ditambahkan 5 ml eter dan diuapkan di dalam cawan penguap. Residu ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Ekstrak mengandung sterol atau terpen apabila terbentuk warna merah-hijau atau violet-biru.

Flavonoid

Beberapa mg ekstrak ditambahkan 4 ml etanol hingga ekstrak larut.

a. 2 ml larutan ditambahkan 0,5 gram serbuk seng dan 2 ml HCl 2N, didiamkan selama 1 menit. Kemudian ditambahkan 10 tetes HCl pekat, apabila terbentuk warna merah intensif dalam waktu 2-5 menit menunjukkan adanya flavonoid (glikosida-3-flavonol)

b. 2 ml larutan ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium dan 10 tetes HCl pekat, apabila terbentuk warna merah jingga sampai merah ungu menunjukkan flavonoid atau kuning jingga menunjukkan adanya flavon, kalkon dan auron.

c. Ekstrak dilarutkan dalam aseton kemudian sedikit serbuk halus asam borat dan serbuk asam oksalat, dipanaskan hati-hati dan dihindari pemansan berlebihan. Sisa dicampur dengan 10 ml eter. Diamati

di bawah sinar UV 366 nm, jika larutan berflurosensi kuning intensif menunjukkan adanya flavonoid.

Tanin

Beberapa mg ekstrak kental ditambahkan 15 ml air panas kemudian dipanaskan hingga mendidih selama 5 menit lalu ditambahkan beberapa tetes FeCl₃ 1 % menghasilkan hijau violet.

Saponin

500 mg ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 ml air panas, dinginkan dan kocok kuat-kuat selama 10 detik. Terbentuk buih yang mantap setinggi 1 hingga 10 cm selama tidak kurang dari 10 menit. Pada penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang.

Uji Toksisitas dengan metode BSLT

Pengujian sifat toksisitas dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethal Test*) melalui beberapa tahapan sebagai berikut :

a. Penetasan Larva Udang

Telur udang ditempatkan pada kotak penetasan yang telah diberi air laut secara perlahan sampai setengah dari volume total dan bagian kotak yang berisi telur udang ditutup dengan aluminium foil. Kotak yang telah ditutup ditempatkan di bawah sumber cahaya 5 watt (24-28 °C). Setelah 48 jam, *nauplii* udang (larva) dikumpulkan menggunakan pipet, kemudian larva *A. salina* siap untuk digunakan pada uji toksisitas (Pisuthanan, dkk., 2004; Rakhmawati, dkk., 2009; Wanyoike, dkk., 2004).

b. Persiapan Larutan yang akan Diuji

Ekstrak dan senyawa murni yang akan diuji dibuat konsentrasi 1000, 500, 100 dan 10 µg/mL dalam air laut, apabila sampel tidak larut tambahkan 2 tetes DMSO (dimetil sulfoksida).

c. Uji Toksisitas Metode Meyer

Larva udang yang hidup sebanyak 10-15 ekor dimasukkan ke dalam vial uji yang berisi 100 µL air laut, tambahkan larutan contoh yang akan diuji masing-masing 10, 100, 500 dan 1000 µg/mL. Larutan diaduk sampai homogen, untuk setiap konsentrasi dilakukan tiga kali pengulangan. Sebagai kontrol dilakukan dengan tidak menambahkan sampel, kemudian didiamkan selama 24 jam, selanjutnya dihitung jumlah larva udang yang mati dan yang masih hidup. Tingkat kematian atau mortalitas dihitung dengan membandingkan antara jumlah larva yang mati dibagi dengan jumlah larva udang.

Dibuat grafik antara log konsentrasi terhadap mortalitas. Nilai LC₅₀ didapat dengan cara menarik garis pada nilai 50 % dari sumbu mortalitas sampai memotong sumbu grafik, perpotongan garis ditarik ke garis konsentrasi dimana zat menyebabkan kematian 50 % larva yang disebut LC₅₀. Suatu zat dikatakan aktif atau toksik bila nilai LC₅₀ ≤ 1000 µg/mL. (Meyer, 1982).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tumbuhan merupakan sumber senyawa bioaktif yang penting untuk pengembangan agen terapeutik baru. Sudah banyak yang melaporkan mengenai sifat-sifat anti bakteri, antivirus, antijamur dari berbagai tumbuhan (Lachumy, dkk., 2010). Oleh karena itu, pengamatan tersebut membantu untuk mengembangkan obat baru sebagai agen terapeutik. Akan tetapi, penelitian mengenai bioaktivitas dari *M. fatua* masih sedikit dan belum ada yang melakukan studi mengenai penapisan fitokimia dan efek toksisitas terhadap larva udang *A. salina* dari daun *Myristica fatua*. Oleh karenanya, kami melaporkan hasil penapisan fitokimia dan uji toksisitas dari daun *M. fatua*.

Pada penelitian ini, ekstrak metanol daun *M. fatua* diuji secara kualitatif kandungan golongan senyawa tanin, alkaloid, terpenoid, flavonoid dan saponin yang dapat dilihat pada Tabel 1. Dari hasil skrining fitokimia tersebut ekstrak metanol mengandung terpenoid/steroid, flavonoid, dan tanin (fenolik).

Uji BSLT dilakukan terhadap ekstrak metanol, etanol 70% dan aseton, sebagai kontrol dipergunakan air laut yang tidak ditambahkan sampel. Metode uji toksisitas ini dilakukan karena biayanya murah dan hasilnya dapat dipercaya (Lachumy, et al., 2010). Pada uji ini diamati adalah tingkat mortalitas yang disebabkan oleh senyawa uji. Menurut Meyer, et al.,

1982, senyawa aktif akan menghasilkan mortalitas yang tinggi, senyawa dengan $LC_{50} \leq 1000 \mu\text{g/mL}$ dapat dikategorikan sebagai senyawa yang mempunyai potensi sebagai senyawa yang bersifat toksik, semakin kecil nilai LC_{50} nya maka senyawa tersebut dikatakan semakin aktif/toksik. Hasil uji BSLT dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 1. Penapisan fitokimia ekstrak metanol daun *Myristica fatua*

No.	Jenis uji	Hasil uji
1	Terpenoid/Steroid	++
2	Alkaloida	-
3	Flavonoida	+
4	Saponin	-
5	Tanin	+++

Keterangan :

Tanin : (+) terbentuk warna hijau kehitaman

Flavonoida : (+) terbentuk warna kuning jingga

Saponin : (+) terbentuk buih stabil

Terpenoid/Steroid: (+) terbentuk warna merah-hijau

Berdasarkan Tabel 2, ekstrak metanol daun *M. fatua* menunjukkan LC_{50} paling kecil (paling toksik) dibandingkan ekstrak etanol 70% dan aseton sehingga ekstrak metanol difraksinasi lebih lanjut dengan ekstraksi cair-cair bertingkat berdasarkan kepolaran menggunakan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan *n*-butanol. Hasil uji dari fraksi-fraksi tersebut dapat dilihat pada Tabel 3.

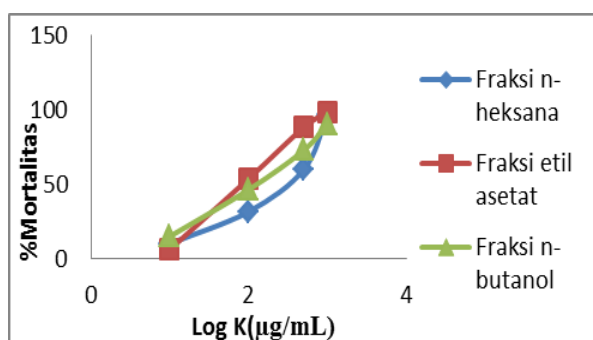
Tabel 2. Analisa hasil *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dari ekstrak metanol, etanol 70% dan aseton dari daun *M. F. fatua*

No	Sampel Daun <i>M. fatua</i>	Konsentrasi (K), ppm	Log K	Mortalitas	LC_{50}
1	Ekstrak Metanol	5	0,7	3,33	64,57
		10	1	13,04	
		50	1,7	35,14	
		100	2	66,67	
2	Ekstrak Etanol 70%	10	1	1,61	>1000
		100	2	10,64	
		500	2,7	29,73	
		1000	3	61,29	
3	Ekstrak Aseton	10	1	13,24	141,25
		100	2	35,59	
		500	2,7	66,10	
		1000	3	88,41	

Tabel 3. Analisa hasil *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dari fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan *n*-butanol dari daun *M. fatua*

No	Sampel Daun <i>M. fatua</i>	Konsentrasi (K), ppm	Log K	Mortalitas	LC_{50}
1	Fraksi <i>n</i> -heksana	10	1	10,15	153,108
		100	2	31,58	
		500	2,7	60,00	
		1000	3	96,67	
2	Fraksi etil asetat	10	1	6,25	83,75
		100	2	53,85	
		500	2,7	88,46	
		1000	3	98,68	
3	Fraksi <i>n</i> -butanol	10	1	15,00	100,93
		100	2	46,43	
		500	2,7	73,01	
		1000	3	90,79	

Pada Tabel 3 di atas dapat dilihat bahwa fraksi etil asetat mempunyai nilai LC_{50} paling kecil dibandingkan fraksi *n*-heksana dan *n*-butanol, yang dapat diilustrasikan pada Gambar 1 di bawah ini. Oleh karenanya, fraksi etil asetat dengan nilai LC_{50} 83,75 $\mu\text{g/mL}$ dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai antitumor/anti kanker (Singh, dkk., 2015). Akan tetapi, fraksi *n*-heksana dan *n*-butanol juga mempunyai efek toksik yang cukup baik dengan $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$.



Gambar 1. Grafik hasil uji toksisitas dengan metode BSLT dari fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan *n*-butanol dari daun *M. fatua* Houtt

KESIMPULAN

Hasil skrining fitokimia dari ekstrak metanol daun *Myristica fatua* Houtt mengandung terpenoid/steroid, flavonoid, dan tanin (fenolik). Berdasarkan hasil uji toksisitas menggunakan metode BSLT, ekstrak metanol dan fraksi etil asetat mempunyai efek toksik yang paling tinggi dibandingkan ekstrak dan fraksi lainnya sehingga berpotensi untuk dikembangkan sebagai antitumor atau antikanker.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terimakasih kepada kegiatan Mandiri Pusat Penelitian Kimia LIPI dan Indonesia Toray Science Foundation yang telah membiayai penelitian ini. Kami juga mengucapkan terimakasih

kepada Dr. Akhmad Darmawan atas diskusi mengenai penelitian dari tumbuhan *Myristica fatua* di Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Arrijani. (2005). Review: Biologi dan Konservasi Marga *Myristica* di Indonesia. *Biodiversitas*, 6 (2), 147-151.
- Depkes RI. (1989). *Materia Medika Indonesia, Jilid V*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 549-553.
- Jamal, Y & Agusta, A. (2004). Komposisi Kimia Minyak Atsiri Pala Wegio (*Myristica fatua* Houtt), *Berita Biologi*, 3, 155-158.
- Lachumy, S.J.T., Sasidharan, S., Sumathy, V. & Zuraini, Z. (2010). Pharmacological activity, phytochemical analysis and toxicity of methanol extract of *Etilingera elatior* (torch ginger) flowers, *Asian Pasific Journal of Tropical Medicine*, 769-774.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E. & McLaughlin, J.L. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45, 31-34.
- Pisutthanant, S., Plianbangchang, P., Pisuthanan, N., Ruanruay, S. & Muanrit, O. (2004). Brine Shrimp Lethality Activity of Thai Medicinal Plants In the Family Meliaceae, *Naresuan University Journal*, 12(2), 13-18.
- Rakhmawati, R., Anggarwulan, E. & Retnaningtyas, E. (2009). Potency of Lobak Leaves (*Raphanus sativus* L. var. *hortensis* Back) as Anticancer and Antimicrobial Candidates, *Biodiversitas*, 10, 158-162, ISSN: 1412-033X.
- Singh, G.S., Al-Kahraman, Y.M.S.A., Mpadi, D. & Yasinzai, M. (2015). Synthesis, Antimicrobial, and Brine Shrimps Lethality Assays of 3,3-Diaryl-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)azetid-2-ones, *J. Heterocyclic Chem*, 52, 614.
- Wanyoike, G.N., Chhabra, S.C., Lang'at-Thoruwa, C.C. & Omar, S.A. 2004. Brine shrimp toxicity and antiplasmodial activity of five Kenyan medicinal plants, *Journal of Ethnopharmacology*, 90, p:129-133.