

IDENTIFIKASI SENYAWA DAN UJI AKTIVITAS EKSTRAK ETIL ASETAT KULIT KAYU MASSOI (*Cryptocarpa massoy*)

Bustanussalam¹, Haryanto Susilo², Endang Nurhidayati²

¹Laboratorium Kimia Bahan Alam, Pusat Penelitian Bioteknologi
Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) - Cibinong

²Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Pakuan

Email : bustanussalam@lipi.go.id

ABSTRAK

Massoi (*Cryptocarpa massoy*) merupakan jenis tumbuhan yang selama ini sudah digunakan oleh masyarakat lokal Papua sebagai obat tradisional. Bagian yang dimanfaatkan dari tumbuhan ini adalah kulit kayu yang diekstraksi untuk menghasilkan minyak. Pemanfaatan kulit kayu Massoi oleh masyarakat lokal selama ini masih dirasakan kurang optimal, oleh karena belum banyaknya penelitian terkait kandungan senyawa kimia dan khasiat penggunaan kulit kayu Massoi secara farmakologis. Penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa bioaktif ekstrak etil asetat kulit kayu Massoi serta menguji aktivitasnya sebagai antibakteri, antioksidan dan mengetahui tingkat toksisitasnya. Kulit kayu Massoi diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol dan dipartisi dengan pelarut air : etil asetat (1:1). Ekstrak etil asetat kulit kayu Massoi diuji fitokimia, aktivitas antibakteri, toksisitas dan antioksidan. Selanjutnya untuk mengidentifikasi adanya senyawa tertentu dilakukan pemisahan, pemurnian dan identifikasi secara kromatografi. Pengujian fitokimia ekstrak etil asetat kulit kayu Massoi diketahui mengandung senyawa tertentu golongan minyak atsiri, flavonoid, tanin, steroid, triterpenoid dan kumarin. Hasil uji aktivitas diketahui bahwa ekstrak etil asetat kulit kayu Massoi memiliki aktivitas positif sebagai senyawa sitotoksik dengan LC_{50} sebesar 12,12 ppm (sangat toksik) dan sebagai antioksidan kuat dengan IC_{50} sebesar 44,02 ppm. Hasil pemisahan senyawanya yang dilakukan dengan kromatografi kolom didapat 7 fraksi yang dikelompokkan berdasarkan profil kromatogram KLT hasil kromatografi kolom yang meliputi bentuk noda, warna, dan waktu retensinya. Hasil analisis KCKT didapatkan fraksi dengan area terbesar terdapat pada fraksi 4 sebesar 95042975 pada waktu retensi 10,050 menit. Fraksi 4 dianalisis dengan menggunakan GC-MS untuk mengetahui komponen senyawa yang terdapat di dalamnya, hasil analisisnya didapatkan 13 senyawa terbesar yang mempunyai persen kemiripan antara 95-99 % dari data *Library* program GC-MS.

Kata kunci : *Cryptocarpa Massoy*, toksisitas, antibakteri, antioksidan, analisis kromatografi

COMPOUND IDENTIFICATION AND ACTIVITY TEST OF ETHYL ACETATE EXTRACTS OF BARK OF MASSOI (CRYPTOCARPA MASSOY)

ABSTRACT

Massoi (*Cryptocarpa massoy*) is one of of plants that has been used by the local people of Papua as traditional medicine. Part of the plant used is the bark that had extracted to produce oil. The utilization of Massoi bark by local communities all these times still less optimal, because studies related to the content of chemical compounds and efficacy of the use of bark Massoi pharmacologically are still limited. This study was conducted to identify bioactive compounds in ethyl acetate extract of the bark of Massoi and to its test activities as antibacterial, antioxidant and to determine its toxicity level. The bark of Massoi extracted by maceration method using methanol and partitioned with mixture of water : ethyl acetate (1:1).

Ethyl acetate extract of bark of Massoi was tested for its phytochemical, and its antibacterial, antioxidants and toxicity. Furthermore, to identify the presence of specific compounds, separation, purification and identification by chromatography were done. Phytochemical test of ethyl acetate extract of bark Massoi group showed several compounds, i.e essential oils, flavonoids, tannins, steroids, triterpenoids and coumarin. The test results showed that the ethyl acetate extract of the bark Massoi have positive activity as cytotoxic compounds with LC_{50} of 12.12 ppm (extremely toxic) and showed its potency as a powerful antioxidant with IC_{50} of 44.02 ppm. Based on the results of compounds separation performed by column chromatography 7 fractions were obtained grouped by their TLC chromatogram profile from column chromatography analysis results including stain shape, color, and retention time. HPLC analysis results found fractions with the largest area contained in fraction 4 at 95,042,975 at retention time of 10.050 minutes. The fraction 4 were analyzed by GC-MS to identify the components of compounds and obtained 13 compounds that have the greatest percent similarity between 95-99% of the GC-MS data Library program.

Keywords: *Cryptocarpa Massoy*, toxicity, antibacterial, antioxidant, chromatographic analysis

PENDAHULUAN

Kecenderungan kembali ke alam atau lebih dikenal dengan istilah “*back to nature*”, memberikan arahan baru di Indonesia untuk mengembangkan potensi keanekaragaman hayati yang dimilikinya. Tidak kurang dari 1260 jenis tumbuhan yang terdapat di hutan hujan tropika merupakan kekayaan Sumber Daya Alam yang dapat digunakan sebagai bahan obat, baik untuk obat tradisional maupun sebagai bahan baku obat modern. Terdapat kurang lebih 85 jenis pohon hutan yang berguna sebagai bahan baku obat di Indonesia. Salah satu tumbuhan hutan di Indonesia yang berkhasiat obat adalah tumbuhan Massoi yang berasal dari famili Lauraceae.

Massoi (*Cryptocarpa massoy*) merupakan jenis tumbuhan yang selama ini sudah digunakan oleh masyarakat lokal Papua sebagai obat tradisional. Bagian yang dimanfaatkan dari tumbuhan ini adalah kulit kayu yang diekstraksi untuk menghasilkan minyak. Beberapa penelitian Etnobotani pada masyarakat lokal Papua memberikan informasi bahwa minyak kulit massoi digunakan sebagai bahan jamu, obat cacing dan obat untuk kejang perut (Komaryati *et al.*, 1995). Batang pohon *Cryptocarpa massoy* mengandung minyak yang mudah menguap sebanding dengan kayu manis. Di pulau Jawa, tumbuhan ini digunakan sebagai

bahan rempah utama bagi berbagai obat tradisional dengan serangkaian manfaat, selain itu Massoi juga digunakan sebagai bahan campuran pewarna untuk pembuatan batik Jawa.

Pemanfaatan kulit kayu Massoi oleh masyarakat lokal selama ini masih dirasakan kurang optimal, oleh karena belum banyaknya penelitian terkait kandungan senyawa kimia dan khasiat penggunaan kulit kayu Massoi secara farmakologis, sehingga penggunaannya sampai saat ini hanya berdasarkan pada data-data empiris dan belum dapat digunakan secara meluas oleh masyarakat pada umumnya. Untuk itu penelitian lebih lanjut mengenai tumbuhan ini diharapkan dapat memberikan tambahan informasi yang dapat dipergunakan untuk memaksimalkan penggunaannya dalam bidang kesehatan sebagai obat tradisional. Didasarkan pada permasalahan tersebut, maka penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa bioaktif ekstrak etil asetat kulit kayu Massoi serta menguji aktivitasnya sebagai antibakteri, antioksidan dan mengetahui tingkat toksisitasnya.

METODE PENELITIAN

Bahan

Serbuk simplisia kulit kayu massoi (*Cryptocarpa massoy*), metanol, etil asetat, aquades, kloroform, DPPH, serum sulfat,

kloramfenikol, bakteri (*Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), pereaksi (Meyer, Dragendorf, Buchardat, Lieberman, dan FeCl_3), telur *Artemia salina* L., dan garam laut.

Alat

Mesin penyerbuk simplisia (Fort Wayne, Indiana®), *rotavapor*, neraca analitik, corong pisah, seperangkat alat Kromatografi Lapis Tipis (KLT), lampu UV 254 nm dan 365 nm, cawan petri, sonicator, hot plate, kolom kromatografi, autoklaf, Laminar Air Flow, pipet mikro, shaker, oven, TLC plat Aluminium silika gel GF₂₅₄, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (*Shimadzu Liquid Chromatograph LC-6AD*®), Spektrofotometer (Beckman DU-650®), Gas Chromatography-Mass Spectro (Agilent 5975®) serta alat-alat gelas dan alat-alat umum lainnya yang lazim digunakan di dalam laboratorium kimia.

Cara Kerja

Penelitian dilakukan dalam dua tahap. Tahap pertama dilakukan analisis pendahuluan terhadap sampel untuk mengetahui identitas dan gambaran umum sampel uji, yaitu berupa: determinasi tumbuhan (sampel), preparasi sampel (pembuatan serbuk simplisia dan ekstrak) dan uji fitokimia. Tahap kedua dilakukan analisis kimia lanjutan, yaitu uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram, uji aktivitas antioksidan dengan metode Penangkapan Radikal Bebas, serta uji toksisitas dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Kemudian dilakukan pemisahan, pemurnian dan identifikasi senyawa dengan menggunakan analisis KLT, kromatografi kolom, KCKT dan GC-MS.

Preparasi Sampel

Simplisia yang digunakan dalam penelitian ini merupakan koleksi Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI Cibinong, yang diperoleh dari Lembah Baliem, Wamena, Irian Jaya. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan cara maserasi dengan menggunakan pelarut metanol. Maserat metanol yang didapat kemudian dievaporasi dengan

menggunakan rotavapor, hingga didapat ekstrak kental. Ekstrak kental dipartisi menggunakan pelarut etil asetat : air (1:1) sebanyak 600 ml yang dilakukan sebanyak tiga kali. Fase etil asetat yang sudah terpisah dari fase air diambil, kemudian dievaporasi menggunakan *rotavapor* sampai didapat ekstrak hampir kental, kemudian diangin-anginkan hingga pekat/kental.

Uji Fitokimia

Uji fitokimia dilakukan terhadap senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, polifenol, uji steroid/terpenoid, saponin, kuinon, kumarin dan minyak atsiri.

Uji Antibakteri

Ekstrak etil asetat sebelum difraksinasi dengan kromatografi kolom, dilakukan uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram. Bakteri uji yang digunakan adalah *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Sebagai kontrol positif digunakan kloramfenikol dan etil asetat sebagai kontrol negatif.

Larutan uji dibuat dalam tiga konsentrasi yang berbeda yaitu 500, 1000, 1500 ppm. Kontrol positif dibuat dalam konsentrasi 500 ppm. Kertas cakram yang telah disterilkan dicelupkan ke dalam larutan kontrol positif dan ke dalam masing-masing larutan uji yang terdiri dari tiga konsentrasi (500, 100, 1500 ppm), diletakkan di atas media inokulum. Dilakukan pengamatan selama tiga hari dengan menghitung luas Diameter Daerah Hambat (mm).

Uji Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dengan metode Penangkapan Radikal Bebas dengan pereaksi DPPH, dilakukan dengan menggunakan Vitamin C sebagai kontrol positif. Preparasi larutan blanko dibuat dari larutan DPPH 1 mM dipipet 1 Ll ke dalam tabung reaksi yang telah ditera 5 ml, lalu ditambahkan metanol hingga 5 mL dan dihomogenkan. Larutan uji dibuat dalam konsentrasi sampel masing-masing 5, 10, 25, 50, 100 ppm.

Kontrol positif dibuat dalam konsentrasi masing-masing 3, 6, 9, 12 dan 15 ppm. Larutan blanko, larutan uji dan larutan kontrol positif segera diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C, kemudian serapan dibaca pada panjang gelombang 515 nm.

Uji Toksisitas

Larutan ekstrak dibuat dalam konsentrasi masing-masing 1000, 100, dan 10 ppm. Sebagai pembanding disiapkan larutan blanko yang sama namun tidak disertai penambahan ekstrak. Uji toksisitas BSLT dilakukan dengan cara memasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* L. untuk tiap-tiap perlakuan ke dalam botol vial yang telah berisi air laut salinitas 12% dan larutan blanko. Setelah 24 jam, dilakukan pengamatan dengan menghitung jumlah larva udang yang mati. Dari data yang diperoleh, dihitung nilai LC_{50} dengan menggunakan analisis probit dengan selang kepercayaan 95%.

Analisis Kromatografi Lapis Tipis/ KLT

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan bertujuan untuk mengetahui pola kromatogram yang dihasilkan dari pemisahan senyawa yang terdapat pada sampel. Eluen yang digunakan merupakan kombinasi dari beberapa pelarut (heksan, etil asetat, kloroform, aseton, metanol dan air) dengan perbandingan tertentu, dan telah dijenuhkan terlebih dahulu. Kemudian lempeng diamati di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm, di semprot menggunakan penampak bercak serum sulfat, dan dikeringkan di atas pemanas. Hasil yang didapat tersebut diamati, dan eluen yang menghasilkan pemisahan terbaik selanjutnya digunakan sebagai eluen pada kromatografi kolom dan HPLC.

Fraksinasi dengan Kromatografi Kolom

Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan cairan eluasi pada KLT yang sesuai sebagai fasa gerak dan silika gel sebagai fasa diam. Sebanyak 4 g ekstrak etil asetat kulit kayu *Massoi* dimasukkan ke dalam kolom kaca yang telah berisi silika gel. Ditambahkan cairan eluasi secara

gradient menggunakan *n*-heksan : etilasetat (10:1 - 1:1) dilanjutkan kloroform : metanol (5:1 - 1:1) dan dibiarkan mengalir melalui kolom. Adanya senyawa dalam fraksi-fraksi tersebut dideteksi dengan KLT, fraksi yang mempunyai pola yang sama selanjutnya digabungkan menjadi satu sehingga diperoleh fraksi yang mempunyai sifat hampir sama. Setelah itu dilakukan analisis KLT kembali dengan eluen yang sesuai, kemudian noda pada KLT divisualisasi dengan lampu UV 254 nm dan 366 nm, dan disemprot dengan penampak bercak serum sulfat. Fraksi-fraksi yang dihasilkan ini kemudian akan diuji aktivitas kembali (hasil yang positif) dan digunakan untuk analisis KCKT dan GC-MS.

Analisis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Fase gerak yang digunakan adalah campuran pelarut heksan-etil asetat (2:1) dan fase diam menggunakan Shperisorb S5W (untuk senyawa non polar). Kondisi alat diatur dengan flow rate 1 ml/menit, tekanan 121-141 kg/cm² dan pada panjang gelombang 230 nm. Fraksi-fraksi yang didapat dari hasil pemisahan kromatografi kolom dilarutkan dengan metanol sampai larut, kemudian disaring dengan kertas saring Millipore 0,45 µm, masing-masing fraksi diinjeksikan 20 µl menggunakan *syringe*.

Analisis Kromatografi Gas- Spektrometri Massa (GC-MS)

Sampel fraksi 4 ekstrak etil asetat kulit kayu *Massoi* di analisis dengan instrumen GC-MS *Agilent 5975* untuk mengetahui senyawa organik yang terdapat di dalamnya. Sebelumnya fraksi 4 yang telah difraksinasi pada kromatografi kolom, dimurnikan dengan menggunakan KLT Preparatif. KLT preparatif yang dilakukan menggunakan fase gerak heksan-etil asetat (2:1) dan fase diam silika yang dilapisi pada lempeng kaca. Hasil KLT dikerok dan dilarutkan dengan kloroform. KLT preparatif dilakukan sebanyak dua kali pengulangan hingga didapatkan pola bercak tunggal, untuk kemudian siap dianalisis dengan GC-MS.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Preparasi Sampel

Serbuk kulit kayu Massoi diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan metano sebagai pelarut. Maserasi bertujuan untuk menghindari terjadinya kerusakan terhadap komponen organik penyusunnya. Maserat yang diperoleh dari proses maserasi, dipartisi dengan ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut etil asetat - air (1:1).

Ekstrak etil asetat kulit kayu Massoi dari hasil pemisahan yang didapat kemudian digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini.

Tabel 1. Hasil Rendemen Partisi

Sampel	Bobot awal (gr)	Fase	Berat (gr)	Rendemen (%)
kulit kayu Massoi	200	Etil asetat	6,2931	3,1465
		Air	8,2206	4,1103

Keterangan : Rendemen didasarkan pada perbandingan bobot awal serbuk simplisia dengan bobot akhir ekstrak etil asetat.

Uji Fitokimia

Hasil uji fitokimia ekstrak etil asetat kulit kayu Massoi menunjukkan hasil positif pada senyawa golongan minyak atsiri, flavonoid, tanin, steroid, terpenoid, dan kumarin. Hasil uji fitokimia pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak etil asetat kulit kayu massoi

Uji Fitokimia	Hasil	Keterangan
Minyak Atsiri	+++ (+)	berbau aromatik
Flavonoid	++ (+)	terbentuk warna kuning/merah /jingga
Tanin	+ (+)	terbentuk warna biru tua/hijau kehitaman
Steroid/ Terpenoid	+ (+)	terbentuk warna merah
Kumarin	+ (+)	berfluoresensi hijau/biru
Alkaloid	- (-)	tidak terbentuk endapan merah bata/putih
Saponin	- (-)	tidak terbentuk busa
Kuinon	- (-)	tidak terbentuk warna merah

Uji Antibakteri

Hasil pengukuran Diameter Daerah Hambat ekstrak etil asetat kulit kayu Massoi dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Pengamatan Diameter Daerah Hambat (DDH)

Konsentrasi	Populasi larva udang (ekor)	Letal (kematian) Ulangan			Rata-rata
		1	2	3	
Blanko	10	-	-	-	0
10 ppm	10	2	4	2	2.67
100 ppm	10	10	10	10	10
1000 ppm	10	10	10	10	10

Pengujian antibakteri ekstrak etil asetat kulit kayu Massoi menunjukkan hasil negatif, dimana dari ketiga konsentrasi larutan yang dibuat 500 ppm, 1000 ppm, dan 1500 ppm menghasilkan DDH 0 mm, yang berarti larutan ekstrak kulit kayu Massoi tidak menunjukkan aktivitas sebagai antibakteri. Kontrol positif menggunakan larutan kloramfenikol 500 ppm yang menghasilkan DDH 1600 mm, dan kontrol negatif dengan menggunakan larutan etil asetat menunjukkan DDH 0 cm.

Uji Toksisitas Larva Udang (*Brine Shrimp Lethality Test*)

Hasil uji toksisitas ekstrak etil asetat terhadap larva udang dapat diketahui dengan menghitung jumlah larva udang yang mati. Tabel 4 merupakan rekapitulasi nilai persen kematian larva udang dari masing-masing konsentrasi tiap sampel pada uji toksisitas, dari hasil ini kemudian dapat dihitung nilai LC_{50} menggunakan analisis probit. LC_{50} merupakan konsentrasi yang mematikan 50% dari populasi hewan uji. Dari percobaan ini, nilai LC_{50} ekstrak etil asetat kulit kayu Massoi adalah 12,12 ppm. Nilai LC_{50} 12,12 ppm menunjukkan tingkat toksisitas yang sangat toksik, senyawa dikatakan sangat toksik apabila nilai LC_{50} lebih kecil atau sama dengan 30 ppm.

Tabel 4. Hasil Uji Toksisitas ekstrak etil asetat kulit kayu Massoi terhadap larva udang

Keterangan	Konsentrasi Larutan (ppm)	Diameter Daerah Hambat (mm)	
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Larutan Uji	500	0	0
	1000	0	0
	1500	0	0
Kontrol Positif	500	1600	1400
	1000	0	0
	1500	0	0

Menurut Meyer (1982), hasil toksisitas yang tinggi ditunjukkan dengan nilai konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% larva udang, semakin kecil nilai yang dimiliki ekstrak tanaman maka akan semakin toksik. Meyer (1982) juga memaparkan, senyawa kimia berpotensi bioaktif jika memiliki nilai LC_{50} kurang dari 1000 ppm. Oleh karena itu ekstrak etil asetat kulit kayu

Massoi dapat dikatakan mempunyai potensi bioaktivitas.

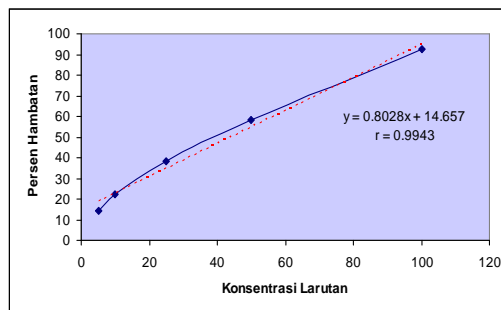
Antioksidan

Ekstrak etil asetat kulit kayu Massoi diuji aktivitas antioksidan dengan pereaksi DPPH dan vitamin C sebagai kontrol positif. Ekstrak Etil asetat kulit kayu Massoi dibuat dalam deret konsentrasi yang berbeda dimaksudkan untuk menentukan IC_{50} . Dari tabel diatas dapat diketahui nilai IC_{50} ekstrak etil asetat kulit kayu Massoi adalah sebesar 44,02 ppm. Ekstrak etil asetat kulit kayu Massoi dapat dikatakan sebagai antioksidan kuat karena nilai $IC_{50} < 100$ ppm. Menurut Mardawati *et al.* (2008), secara spesifik suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan kuat jika nilai IC_{50} bernilai 51-100, sedang jika IC_{50} bernilai 101-150, dan lemah jika IC_{50} adalah 151-200.

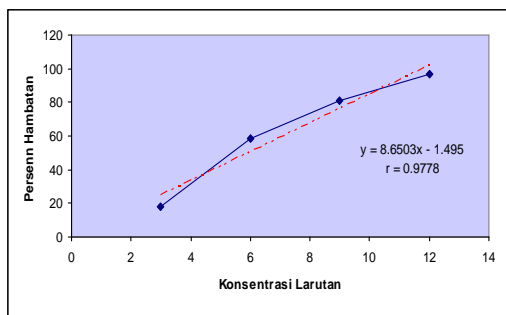
Nilai penghambatannya dapat dilihat dengan menghubungkan persen hambatan dengan konsentrasi larutan, seperti yang tertera pada Gambar 7 dan 8.

Tabel 5. Hasil uji antioksidan ekstrak etil asetat kulit kayu Massoi

Larutan	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	Hambatan (%)	IC_{50} (ppm)
Blanko	0	2,3377	0	44,02
	5	1,9973	14,56	
	10	1,8137	22,41	
	25	1,4472	38,09	
	50	0,9803	58,06	
	100	0,1706	92,70	
Kontrol Positif	3	1,9215	17,80	5,95
	6	0,9770	58,21	
	9	0,4506	80,72	
	12	0,0746	96,80	



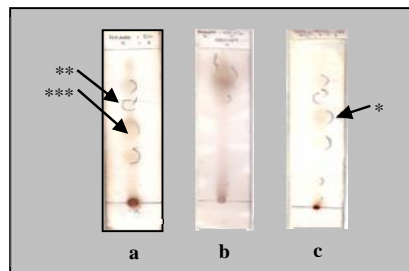
Gambar 7. Kurva konsentrasi inhibisi 50 (IC_{50}) ekstrak etil asetat kulit kayu Massoi



Gambar 8. Kurva konsentrasi inhibisi 50 (IC₅₀) Vitamin C

Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Ekstrak etil asetat kulit kayu Massoi dianalisis KLT dengan menggunakan beberapa pelarut, tujuannya untuk memperoleh profil kromatogram senyawa dengan beberapa perbandingan komposisi. Hasil kromatogram KLT ekstrak etil asetat kulit kayu Massoi dapat dilihat pada Gambar 9. Hasil analisis KLT ekstrak kulit kayu Massoi dapat dilihat pada Tabel 6.



Gambar 9. Kromatogram KLT ekstrak etil asetat kulit kayu Massoi

Tabel 6. Hasil analisis KLT ekstrak etil asetat kulit kayu Massoi

Pelarut	Keterangan Hasil		
	Jumlah Noda	Warna	Rf
Heksan-Etil asetat (2:1)	6	coklat	0,3
		coklat	0,46
		coklat muda	0,66
		coklat muda	0,7
		coklat	0,78
		coklat	0,88
Heksan-kloroform-etil asetat (2:1:1)	6	putih	0,14
		kecoklatan	
		kuning	0,38
		kecoklatan	
		coklat muda	0,56
		putih	0,62
Heksan-Kloroform-metanol (1:1:2)	3	kecoklatan	0,67
		putih kecoklatan	0,67
		coklat muda	0,76
		coklat muda	0,69
		coklat	0,82
		coklat muda	0,93

Keterangan:

Fase gerak

(a): Heksan-Etil asetat (2:1)

(b): Heksan-kloroform-etil asetat (2:1:1)

(c): Heksan-kloroform-metanol (1:1:2)

Fase diam: Silika Gel GF254

Penampak bercak: serum sulfat

Pengamatan:

* noda tampak dibawah sinar UV254 nm

** noda tampak dibawah sinar UV 365 nm

*** noda tampak dengan penampak bercak

Gambar diatas merupakan profil komposisi eluen terbaik dalam analisis KLT yang dilakukan pada penelitian ini. Perbedaan nilai Rf dalam hal ini dapat dipengaruhi oleh komposisi senyawa dalam sampel. Dari hasil analisis ini diperoleh hasil eluen terbaik untuk elusi KLT ekstrak etilasetat kulit kayu Massoi adalah campuran pelarut heksan - etil asetat dengan perbandingan 2:1. Pemilihan eluen tersebut berdasarkan nilai Rf, bentuk dan jumlah spot yang dihasilkan serta pola pemisahan senyawanya.

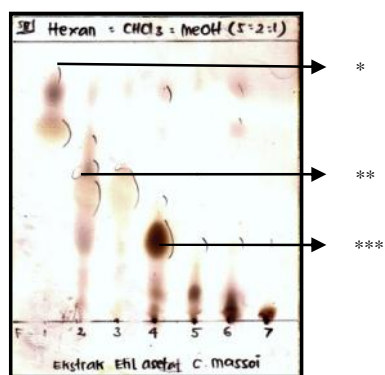
Kromatografi Kolom

Pemilihan pelarut sebelumnya telah dilakukan pada saat KLT dengan pelarut heksan-etil asetat (2:1), sehingga dengan metode gradien komposisi pelarut yang digunakan dimulai dari perbandingan 10:1 sampai dengan 1:1 (untuk pelarut yang sifatnya nonpolar) dan untuk pelarut yang lebih polar digunakan pelarut kloroform-metanol perbandingan 5:1 sampai dengan 1:1. Fraksi-fraksi hasil tampungan eluen yang dikumpulkan didapat sebanyak 203 vial dengan volume rata-rata 14 ml. Fraksi-fraksi ini kemudian dikelompokkan berdasarkan profil kromatogram KLT (Tabel 7).

Tabel 7. Fraksi-fraksi hasil Kromatografi kolom ekstrak etil asetat kulit kayu Massoi

Fraksi	Keterangan	Bobot (mg)
1	gabungan vial 1-4	47,9
2	gabungan vial 5-14	84,9
3	gabungan vial 15-44	403,4
4	gabungan vial 45-69	49,3
5	gabungan vial 70-89	7,7
6	gabungan vial 90-130	40,2
7	gabungan vial 131-203	844,8

Pola kromatogram ketujuh fraksi hasil kromatografi kolom ekstrak etil asetat kulit kayu Massoi dapat dilihat pada Gambar 10. Masing-masing fraksi yang didapat selanjutnya akan dianalisis menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT).



Gambar 10. Kromatogram Fraksi Kromatografi Kolom ekstrak etil asetat kulit kayu Massoi

Keterangan:

Fase gerak : heksan-kloroform-metanol (5:2:1)

Fase diam: Silika Gel GF254

Penampak bercak: serium sulfat

Pengamatan:

* noda tampak dibawah sinar UV254 nm

** noda tampak dibawah sinar UV 365 nm

*** noda tampak dengan penampak bercak

Uji Aktivitas Positif

Aktivitas positif ini dimaksudkan untuk menguji kembali senyawa yang terdapat pada fraksi etil asetat kulit kayu Massoi yang sebelumnya telah difraksinasi dengan kromatografi kolom. Fraksi-fraksi yang di dapat diuji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode penangkapan radikal bebas dengan pereaksi DPPH yang sama dengan pengujian awal. Hasil uji aktivitas antioksidan metode penangkapan radikal bebas dengan peraksi DPPH pada konsentrasi sampel 100 ppm dengan cara spektrofotometri dapat dilihat pada Tabel 8.

Jika hasil uji ini dibandingkan dengan uji antioksidan di awal, hasil uji aktivitas antioksidan pertama lebih besar hambatannya dibandingkan dengan hasil uji aktivitas positif kedua. Ini berarti senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan dalam ekstrak etil asetat kulit kayu Massoi akan lebih aktif jika dalam bentuk sebelum dipisahkan (fraksinasi).

Tabel 8. Hasil Uji Aktivitas Positif Antioksidan Fraksi etil asetat kulit kayu Massoi

Fraksi	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi
Blanko	0	2,3377	0
1	100	1,7776	24,25
2	100	1,7659	24,46
3	100	2,1063	9,90
4	100	1,8369	21,42
5	100	1,6643	28,81
6	100	1,4094	39,82
7	100	0,7375	68,45

Analisis KCKT

Hasil analisis KCKT dibandingkan antara waktu retensi dan area sampel.

Terdapat tiga senyawa yang kemungkinan berada pada beberapa fraksi, senyawa-senyawa tersebut dapat dilihat pada Tabel. 9 di bawah ini.

Tabel 9. Kemungkinan senyawa yang terdapat dalam fraksi hasil analisis KCKT

Senyawa	Fraksi	Waktu Retensi (menit)	Luas Area
1	F1	3.733	38468387
	F2	3.925	9393627
	F6	3.467	2359848
	F7	3.708	11982655
2	F2	6.025	3852263
	F3	6.233	49981059
3	F4	10.05	95042975
	F5	10.1	52415311
	F6	10.083	8882340
	F7	10.125	11338392

Analisis GC-MS

Analisis GC-MS fraksi 4 (F4) ekstrak etil asetat kulit kayu Massoi merupakan tahap lanjutan untuk mengidentifikasi senyawa yang terdapat di dalam sampel. Senyawa-senyawa yang terdapat di dalam Tabel 10. adalah senyawa-senyawa yang mempunyai persen kemiripan berkisar antara 95-99 %. Hasil uji aktivitas positif terhadap ekstrak dan fraksi etil asetat kulit kayu Massoi adalah aktivitasnya sebagai antioksidan.

Menurut (Halliwell dan Gutteridge, 1999) senyawa antioksidan non-enzimatis dapat berupa tokoferol, karotenoid, quinon, bilirubin, asam askorbat, asam urat, dan protein lainnya). Berdasarkan hasil uji fitokimia yang telah dilakukan sebelumnya kemungkinan senyawa yang terdapat dalam sampel adalah senyawa golongan flavonoid. Namun demikian dari ketiga belas senyawa diatas, tidak terdapat adanya senyawa golongan flavonoid hal ini diduga karena keberadaan senyawa tersebut dalam sampel ada dalam konsentrasi kecil sehingga perlu dilakukan pemurnian senyawa (isolasi) lanjutan dan analisis pada fraksi yang lainnya selain fraksi 4 (F4).

Tabel 10. Tiga belas senyawa terbesar hasil analisis GC-MS

No	Library/ ID (senyawa)	RT	% Kemiripan
1	(1-methylene-prophenyl) benzene	4,73	95
2	1,3-cyclohexadien, 1-phenyl	6,18	96
3	3-phenyl-1,4-cyclohexadien	6,60	96
4	1,1-biphenyl	6,81	95
5	3-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde (isovanillin)	6,97	96
6	1,3-cyclohexadien, 1-phenyl	7,26	95
7	6-pentyltetrahydro-2H-pyran-2-one	7,76	96
8	dodecanoic acid	8,18	99
9	benzoic acid	9,86	97
10	n-hexadecanoic acid	11,11	99
11	9,12-octadecanoic acid	12,20	99
12	1,2-benzenedicarboxylic acid, butyl phenylmethyl ester	31,54	97
13	icosane	15,24	96

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Ekstrak etilasetat kulit kayu Massoi (*Cryptocarpa Massoy*) mengandung minyak atsiri, flavonoid, tanin, steroid, triterpenoid dan kumarin. Nilai LC₅₀ diperoleh sebesar 12,12 ppm yang menunjukkan tingkat toksisitas yang sangat tinggi dan nilai IC₅₀ sebesar 44,02 ppm yaitu sebagai antioksidan kuat.

Hasil analisis KCKT ketujuh fraksi hasil kromatografi kolom, didapatkan fraksi dengan waktu retensi dan area terbesar pada fraksi 4, yaitu pada Rt= 10.050 menit dan area 95042975. Aktivitas antioksidan senyawa yang terdapat pada ekstrak etil asetat lebih besar dibandingkan dengan fraksi hasil pemisahan dengan kromatografi kolom, dimana % hambatan ekstrak etil asetat kulit kayu Massoi dengan konsentrasi 100 ppm lebih aktif dibandingkan hasil fraksinasi. Analisis GC-MS senyawa pada fraksi 4, terdapat 13 senyawa terbesar yang mempunyai persen kemiripan antara 95-99 % dari 72 senyawa yang teridentifikasi.

Saran

1. Perlu dilakukan pengeringan ekstrak kental etil asetat kulit kayu Massoi dengan *freezedryer* agar diperoleh ekstrak kering.
2. Perlu dilakukan isolasi senyawa aktif dengan menggunakan pelarut yang sesuai dengan tingkat kepolaran yang lebih.
3. Perlu dilakukan penelusuran senyawa aktif dan uji aktivitas secara kuantitatif untuk mengidentifikasi senyawa kimia yang terdapat pada ekstrak etil asetat kulit kayu Massoi yang mempunyai aktivitas positif sebagai antioksidan dan senyawa sitotoksik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih kami sampaikan kepada:

1. Laboratorium Biofarmaka IV, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) - Cibinong.
2. Program Studi Farmasi, Universitas Pakuan, Bogor.

DAFTAR PUSTAKA

- Alam, G. 2002. *Brine Shrimp Lethality (BSLT) Sebagai Bioassay dalam Isolasi senyawa Bioaktif dari Bahan Alam*. Majalah Farmasi dan Farmakologi. hal-6.
- Departemen Kesehatan RI. 1979. *Farmakope Indonesia*, Edisi III. Direktorat Pengawasan Obat dan Makanan. Jakarta.
- Direktorat Pengawasan Obat dan Makanan. 1985. *Cara Pembuatan Simplisia..* Jakarta.
- Direktorat Pengawasan Obat dan Makanan. 1995. *Farmakope Indonesia*, Edisi IV.. Jakarta.
- Direktorat Pengawasan Obat dan Makanan. 2000. *Parameter standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat..* Jakarta.
- Gariswara, G.S. 1995. *Farmakologi dan Terapi*, Edisi IV. Fakultas Kedokteran, UI Press. Jakarta.
- Gritter, R.J. Bobbit JM. Schwarting AE. 1991. Pengantar Kromatografi, Edisi kedua (Penerjemah: Padmawinata K.

- Soediro I). ITB. Bandung, hal. 23-32.
- Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge. 1990. Role of free radical and catalytic logam ions in humans disease : An overview. *Meth. Enzymol.* 186: 1-83.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia: Penentuan Cara Modern Menganalisis Tumbuhan* (Padmawinata K, penerjemah). ITB. Bandung. hal.84-94.
- Jawets, E., J.L. Melnick dan E.A. Adelberg. 1986. *Mikrobiologi Kedokteran Edisi 20* (penerjemah: Nugroho E, Maulany RF). Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. hal. 143-177.
- Lemmens. 1995. *Plant Resources of South-East Asia No.5(2). Timber Trees: Minor Commercial Timbers*. Blackhuys Publisher. Leiden. 152-161.
- Mardawati, E; F. Filianty dan H. Marta. 2008. *Kajian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Manggis (Garcinia mangostana L) Dalam Rangka Pemanfaatan Limbah Kulit Manggis Di Kecamatan Puspahiang Kabupaten Tasikmalaya*. Fakultas Teknologi Industri Pertanian Universitas Padjadjaran. Bandung.
- Meyer BN. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituent. *Planta Medica.* 45: 31-4.
- Mulyati, A.H. 2007. *Dasar-dasar Kromatografi*. Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Pakuan. Bogor. hal.3-42.
- Nugroho, R.G., Triantoro dan C.M.E. Susanti. 2007. *Kandungan Bahan Aktif Kayu Kulilawang (Cinnamomum culilawane Bl.) dan Masoi (Cryptocaria massoia)*. Balai Penelitian dan Pengembangan Kehutanan Papua Maluku. Manokwari.
- Pujianti, S. Ningsih dan Triwidodo. 2002. *Uji Toksisitas terhadap Larva Artemia Salina dari Fraksi n-*

Heksana, Kloroform, Etil asetat dan Air Eksstrak Etanol Rimpang Temu Mangga (Curcuma magga Val). Fakultas Farmasi, Universitas Surabaya. hal.109.

Rali, T., S.W. Wossa dan D.N. Leach. 2007. *Comparative Chemical Analysis of the Essential Oil Constituents in Bark, Heartwood and Fruits of Cryptocarya massoy (Oken) Kostrem. (Lauraceae) from Papua New Guinea.* Molecules 12(1); 149-154.

Soerbito, S. 1991. *Analisis Senyawa Obat.* Pusat Antar Universitas Ilmu Hayati. ITB. Bandung. hal 131-152.