

**Isolasi dan Uji Bioaktivitas Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak N-Heksan Daun Pare
(*Momordica charantia* L.)
(Isolation and Bioactivity Test of Secondary Metabolites of Bittermelon (*Momordica charantia*
L.) Leaves N -Hexane Extract)**

Muharram

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Makassar

Abstract

Bittermelon (*Momordica charantia* L.) is a bioactivity plant that used as a medicine traditional. The purpose of this research is to isolate the bioactivity secondary metabolites of n-hexane extract from the bittermelon leaves and bioassay toward larval shrimp *A. salina*. Isolation of the secondary metabolites including extraction, fractionation, purification, and identification. Bioassay was conducted to the extract and to mixed fractions (fraction A – G) the results of column chromatography. The results of research showed that the extracts and fractions from bittermelon leaves was toxic to *A. salina*. The LC₅₀ from extracts bittermelon leaves was 91, 84 ppm. The LC₅₀ for the fractions A and B (steroid) were 38,26 ppm and 85,90 ppm, the fractions C – G (terpenoid) were 94,45 ppm; 79,56 ppm; 92,53 ppm; 70,41 ppm; and 92,69 ppm, the most toxic fractions was fraction of A. From the C-fraction as a green color was obtained a crystal and needle-shaped. After recrystallization with n-hexane and ethylacetat was obtained a pure compound that positive to terpenoids with Liebermann-Burchard reagents.

Keywords: *Bioactivity secondary metabolites, N-hexane extract, Bittermelon leaves*

A. Pendahuluan

Pengobatan tradisional telah dikenal sejak lama dan merupakan warisan budaya yang tetap terjaga hingga kini, dan menjadi potensi dan modal dasar untuk mengembangkan obat-obat tradisional yang berasal dari tanaman. Menurut WHO, diperkirakan sekitar 4 milyar penduduk dunia (\pm 80%) menggunakan obat-obatan yang berasal dari tanaman. Bahkan umumnya obat-obatan modern yang digunakan sekarang ini berasal dan dikembangkan dari tanaman obat. WHO mencatat terdapat 119 jenis bahan aktif obat modern berasal dari tanaman obat. Salah satu tanaman yang dikenal memiliki banyak khasiat dan manfaat baik dari segi kesehatan maupun sumber potensi pangan adalah tanaman pare (*Momordica charantica* Linn) (Subahar, T., 2004).

Tanaman pare merupakan tanaman yang dikenal dengan rasa pahitnya. Dibalik rasa pahit, pare mengandung khasiat sebagai obat berbagai jenis penyakit dan berbagai aneka masakan (Subahar, T. 2004). Di beberapa negara terutama Jepang, Korea, dan Cina, pare juga dimanfaatkan sebagai obat gangguan pencernaan, minuman penambah semangat, obat perangsang muntah (Ramsis, N., 2008).

Dalam pare mengandung senyawa fitokimia lutein dan likopen yang berkhasiat sebagai anti kanker, antibiotika, anti virus, perangsang produksi insulin, penyeimbang tekanan darah dan kadar gula darah, perangsang nafsu makan, dan pembasmi cacing (Ramsis, N. 2008). Penelitian yang dilakukan Tarmudji (2004) memperlihatkan bahwa ekstrak daun pare dapat dimanfaatkan untuk memberantas atau mengurangi cacing penghisap darah yang bermukim di dalam lambung domba. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Silfiyanti dan Kristianto, H. (2006) menjelaskan bahwa ekstrak daun pare dapat menghambat pertumbuhan larva *Aedes* Sp untuk mengatasi penyakit demam berdarah (DBD). Hal tersebut diduga karena adanya senyawa alkaloid yang berfungsi sebagai larvasida. Selain alkaloid, ekstrak pare juga mengandung flavonoid yang dimungkinkan berfungsi sebagai antimikroba dan antivirus. Selain itu, pare mengandung triterpenoid yang berfungsi sebagai insektisida, dan mempengaruhi sistem saraf (Mawuntyas, D., 2006). Khasiat pare yang sangat beragam berkaitan erat dengan zat atau senyawa yang dikandungnya. Pare banyak mengandung senyawa metabolit sekunder yang meliputi senyawa golongan alkaloid, terpenoid,

steroid, dan flavanoid. Senyawa kimia tersebut tersebar pada beberapa bagian tanaman seperti akar, batang, daun, dan buah. Umumnya yang dimanfaatkan sebagai obat adalah herba, yaitu bagian tanaman yang berada di atas permukaan tanah selain akar (Harbone. 1987).

Bioaktivitas tanaman sangat dipengaruhi oleh kandungan senyawa kimia yang terdapat didalamnya. Perbedaan kandungan senyawa kimia yang ada menunjukkan perbedaan aktifitas farmakologis dari tanaman yang bersangkutan. Selain dipengaruhi oleh jenis senyawa kimia, metode yang digunakan untuk melakukan uji bioaktivitas juga memegang peranan penting dalam memberikan hasil yang ingin diketahui dari aktifitas tanaman tersebut.

Salah satu metode yang digunakan untuk uji bioaktivitas adalah metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Metode ini sudah digunakan untuk berbagai sistem bioassay yaitu untuk menganalisis residu pestisida, mikotoksin, polutan pada air sungai, anestetik dan sebagainya. Dalam pengujian brine shrimp, untuk senyawa yang bersifat sitotoksik adalah uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach yang diperkirakan mempunyai kemampuan untuk membunuh sel kanker dalam kultur sel. Walaupun pengujian tersebut tidak spesifik untuk aktivitas bahan anti tumor maupun anti kanker, namun mempunyai korelasi positif. Selain itu, metode ini lebih cepat, murah, mudah dan tidak memerlukan kondisi aseptis (Dharma. A. 2001 dalam Lenny, S., 2006c; Ira Miranti, I., 1998).

Hewan uji yang digunakan dalam metode Brine shrimp lethality test adalah *A. salina* merupakan udang-udangan yang digunakan sebagai hewan coba untuk praskrining aktivitas anti-kanker di National Cancer Institute, Amerika Serikat. Selain itu, penggunaan udang *A. salina* ini lebih sederhana dan efektif dalam ilmu biologi dan toksikologi. *A. salina* juga sifatnya tidak beracun.

Tanaman pare merupakan jenis tanaman semak semusim yang tumbuh menjalar atau merambat dengan menggunakan sulur yang panjang. Tanaman pare dapat tumbuh dan berproduksi dengan baik di daerah dataran rendah sampai ketinggian 500 m diatas permukaan laut. Lokasi kebun pare harus memenuhi persyaratan faktor tanah yang memadai. Hampir semua jenis tanah yang digunakan untuk pertanian cocok bagi tanaman pare. Namun demikian tanah yang paling baik bagi tanaman pare adalah tanah lempung pasir yang subur, gembur, serta tingkat

keasamannya (pH) 5 – 6 (Dinas Pertanian Jatim. 2007).

Akar tumbuhan pare adalah berupa akar tunggang berwarna putih. Struktur batang tanaman pare tidak berkayu. Batang tegaknya berusuk lima dan berwarna hijau. Batang mudanya berambut dan akan menghilang setelah tua. Daun pare berbentuk menjari, berbulu, dan berlikuk. Susunan tulang daunnya menjari. Tangkai daun tumbuh dari ketiak daun. Panjang tangkai daunnya mencapai 7-12 cm. Daunnya berwarna hijau tua di bagian permukaan atas dan permukaan bawahnya berwarna hijau muda dan kekuningan. Letak daun pare berselang dengan panjang tangkai 1,5–5,3 cm. Bunga pare tumbuh dari ketiak daun dan berwarna kuning menyala. Bunga pare terdiri dari bunga jantan dan bunga betina yang berduri tempel, halus, dan berambut. Kelopak bunga berbentuk lonceng dan berusuk banyak. Panjang tangkai bunga jantan mencapai 2-5,5 cm, sedangkan tangkai bunga betina panjangnya 1–10 cm. Buah pare berasal dari bunga pare betina yang telah mengalami proses penyerbukan secara alami. Buah ini berbentuk bulat memanjang dengan permukaan berbintil-bintil dan berasa pahit (Subahar, T. 2004).

Kandungan utama daun pare adalah alkaloid, yaitu momordicin. Selain itu, pare juga mengandung steroid, flavanoid, triterpenoid, karotenoid, saponin, asam resinat, resin, vitamin A, B, C serta minyak lemak yang terdiri atas asam olenat, asam stearat, dan L-oleostearat (Ramsis, N, 2008; Subahar, T. 2004).

Agenda dalam pengobatan tradisional, pare merupakan andil yang cukup besar bagi masyarakat. Selain kandungan gizinya yang tinggi, pare juga mempunyai khasiat sebagai obat, sehingga sering dimanfaatkan sebagai bahan ramuan jamu. Di dalam Tradisional Chinese Medicine disebutkan bahwa daun, bunga, batang, akar serta buah pare yang memiliki rasa yang pahit baik dalam bentuk buah muda yang mentah, biji buah yang matang, memiliki khasiat pengobatan. Disamping merangsang nafsu makan, pare dianggap dapat mengobati penyakit gastro intestinal, serta mampu menurunkan kadar gula darah.

Dr. Stanley Rebutan dari Bitter Melon Therapy Group yang berpusat di Los Angeles, Amerika Serikat, menyatakan bahwa pare sangat berguna dalam pengobatan malaria, asma, diabetes, sakit perut, luka gigitan serangga, serta menormalkan siklus menstruasi (Nadesul, H. 2002).

Manfaat lain dari daun pare adalah penurun demam, obat cacung, obat batuk, radang tenggorokan, rasa haus karena panas, demam, malaria, pingsan karena panas, meningkatkan ASI, menambah nafsu makan, rematik, sariawan, sakit saat haid, dan dapat menyuburkan rambut pada anak balita (Subahar, T. 2004).

A.salina merupakan kelompok udang-udangan dari phylum Arthropoda. *A. salina* memiliki kulit yang keras, hidup dalam air, mulai dari air payau sampai air yang berkadar garam tinggi. Apabila kadar garam kurang dari 6% telur *A. salina* akan tenggelam sehingga telur tidak bisa menetas, hal ini biasanya terjadi apabila air tawar banyak masuk ke dalam danau pada musim hujan. Sedangkan apabila kadar garam lebih dari 25% telur akan tetap berada dalam kondisi tersuspensi, sehingga dapat menetas dengan normal.

Mengingat khasiat pare sebagai tanaman obat, maka perlu mengkaji dan meneliti lebih lanjut tentang daun pare tersebut, terutama senyawa metabolit sekunder yang terkandung dan bioaktivitasnya.

B. Metode Penelitian

1. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah chamber dan pelat KLT, kolom kromatografi cair vakum, corong biasa, corong Buchner, evaporator, labu Erlenmeyer berbagai ukuran, gelas ukur berbagai ukuran, neraca analitik, penangas air, bejana maserasi, pipet tetes, batang pengaduk, dan lain-lain. Uji bioaktivitas digunakan alat-alat seperti mikropipet, mikroplate, lampu untuk pencahayaan, dan wadah penetasan telur udang.

Bahan tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk kasar daun pare. Pelarut-pelarut organik yang digunakan 39 ik keperluan ekstraksi (maserasi) dan kro fi kolom cair vakum adalah pelarut yang berkualitas teknis yang telah di evaporasi ulang sedangkan untuk keperluan pemurnian dan karekterisasi digunakan pelarut yang berkualitas pro-analisis (pa). Pelarut-pelarut tersebut adalah n-heksana, dan etilasetat. Larutan pereaksi yang digunakan yaitu pereaksi Liebermann-Burchard (deteksi terpenoid dan steroid).

Bahan lain yang digunakan adalah silica gel 60 H (70-230 mesh), plat KLT aluminium berlapis silica gel GF₂₅₄, aluminium foil. Kemudian pada uji aktivitas digunakan bahan dimetil sulfoksid (DMSO) sebagai pelarut,

aquabides, garam laut NaCl dan telur udang *A. salina*.

2. Prosedur Pelaksanaan Penelitian

Serbuk kasar daun pare (673,3 g) dimaserasi dengan 8 liter n-heksana (3 x 48 jam). Pada hari ketiga, ekstrak dikeluarkan dan residu dimaserasi kembali dengan pelarut yang sama. Prosedur ini dilakukan hingga hasil semua simplisia tanaman pare tertarik ke dalam pelarut. Ekstrak yang diperoleh kemudian diuapkan pelarutnya dengan cara evaporasi hingga diperoleh ekstrak kental.

Ekstrak kental n-heksana yang diperoleh dianalisis menggunakan KLT dengan larutan pengembang (eluen) yaitu etilasetat : n-heksana dengan perbandingan 1: 19, 1:9, 2:8 dan 3:7 yang telah ditentukan sebelumnya dari hasil analisis KLT dengan berbagai variasi eluen untuk menentukan sistem eluen yang akan digunakan pada KKC. Setelah uji hasil KLT dan sistem eluen diketahui, dilakukan pemisahan komponen-komponen di dalam ekstrak dengan kromatografi kolom cair vakum. Sebagai fasa diam digunakan silica gel G 60 dan eluen etilasetat : n-heksana sebagai fase gerak. Hasil fraksinasi dianalisis menggunakan KLT dengan eluen etilasetat: n-heksana dengan perbandingan 1:19 dan 3:7, kemudian fraksi yang kromatogramnya sama dikumpulkan kemudian diuapkan pelarutnya hingga diperoleh padatan, dan dilakukan uji pereaksi Liebermann Burchard untuk menentukan golongan senyawa yang teridentifikasi dan selanjutnya dilakukan uji bioaktivitas terhadap *A. salina*.

Fraksi gabungan (fraksi C) yang diperoleh dari hasil fraksinasi kemudian di lakukan pencucian kristal hingga diperoleh kristal murni. Pada umumnya untuk menguji kemurnian kristal, dapat dilakukan dengan uji KLT dan titik leleh. Akan tetapi, dalam penelitian ini hanya diperoleh kristal putih dan untuk mengetahui kemurnian kristal hanya dilakukan dengan uji KLT.

Kristal yang telah dimurnikan diuji kemurniannya dengan kromatografi lapis tipis dengan tiga sistem eluen, dan selanjutnya diidentifikasi dengan menggunakan pereaksi Liebermann-Burchard.

Uji aktivitas dilakukan dengan metoda "Brine Shrimp Lethality Test" terhadap larva *A. salina*. Adapun untuk uji bioaktif ini langkah-langkahnya sebagai berikut: Larva udang disiapkan dengan cara menetasakan telur *A. salina* dua hari sebelum dilakukan pengujian. NaCl

murni ditimbang 3,8 gram, dilarutkan dalam 100 ml aquabides. Larutan NaCl dituangkan dalam wadah penetasan, kemudian telur *A. salina* dimasukkan ke dalam wadah penetasan. Setelah 2 x 24 jam perendaman, telur akan menetas dan menghasilkan larva *A. salina*.

Sampel (ekstrak dan fraksi A-G) ditimbang sebanyak 1,0019 mg dan dilarutkan dalam pelarut DMSO sebanyak 100 µL kemudian diencerkan dengan 150 µL aquabides. Dari pengenceran tersebut diambil 200 µL diencerkan kembali dengan 600 µL aquabides sehingga volume total menjadi 800 µL. Dengan demikian, konsentrasi sampel menjadi 1 µg/µL. Selanjutnya pengenceran dilakukan dalam mikroplate dengan konsentrasi masing-masing 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm, 31,25 ppm dan 15,625 ppm. Dalam mikroplate baris A dan B diisi sampel masing-masing tiap lubang 100 µL secara triplo, sedangkan baris B sampai G ditambahkan 100 µL aquabides. Dari baris B dipipet 100 µL, dimasukkan ke baris C, dan dari baris C dipipet 100 µL dimasukkan ke baris D dan seterusnya. Pengerjaan blanko dapat dilakukan dengan cara yang sama dengan penyiapan sampel tanpa menggunakan sampel.

Pelaksanaan uji aktivitas dilakukan dengan cara berikut: Larva udang yang telah berumur 2 hari dipipet sebanyak 100 µL air laut buatan dengan jumlah larva 10 ekor dalam volume tersebut, dimasukkan dalam mikroplate yang berisi sampel kemudian didiamkan selama 24 jam. Selanjutnya dihitung jumlah larva udang yang mati. Data yang diperoleh dicatat dan dimasukkan dalam persamaan logaritmik probit untuk mencari LC_{50} .

Teknik analisis data digunakan metode berikut: Perhitungan LC_{50} dilakukan dengan metode logaritmik-probit. Data % kematian ditransformasikan ke dalam log konsentrasi, garis regresi linear ditarik antara nilai probit dengan log konsentrasi. Dari hasil perhitungan LC_{50} ini ditentukan bahwa sampel yang mempunyai harga $LC_{50} < 1000$ ppm bersifat toksik, sebaliknya jika harga $LC_{50} > 1000$ ppm adalah tidak toksik (Gelgel Wirasuta, 1999 dalam Wulawarman, I.D., 2005). Efek toksisitas dianalisis dari pengamatan dengan menghitung % mortalitas = jumlah larva yang mati/jumlah larva uji dikalikan 100. Rumus ini juga berlaku untuk kontrol (blanko), jika pada kontrol terdapat larva *A. salina* yang mati maka % kematian dari sampel yang diuji dikurangi dengan % kematian dari kontrol,

sehingga didapatkan % kematian yang sesungguhnya (Hertiani, T., 2000 dalam Wulawarman, I.D., 2005).

$$\% \text{ mortalitas} = \% \text{ mortalitas sampel} - \% \text{ mortalitas kontrol}$$

Dari persen kematian larva *A. salina* Leach kemudian dicari angka probit menggunakan rumus: $p = r/10 \times 100\%$, p adalah nilai probit, r adalah nilai % kematian. Setelah didapatkan nilai probit kemudian dibuat persamaan garis linier:

$$Y = a + bx$$

Y = angka probit,

x = log konsentrasi,

a = intersep, dan

b = slop

Membuat persamaan garis linier dimaksudkan untuk menentukan nilai a dan b, setelah nilai a dan b diperoleh, harga LC_{50} dapat diperoleh dengan memasukkan nilai probit = 5 (50% kematian), sehingga dapat dihitung $LC_{50} = \ln v \log 5 - a/b$.

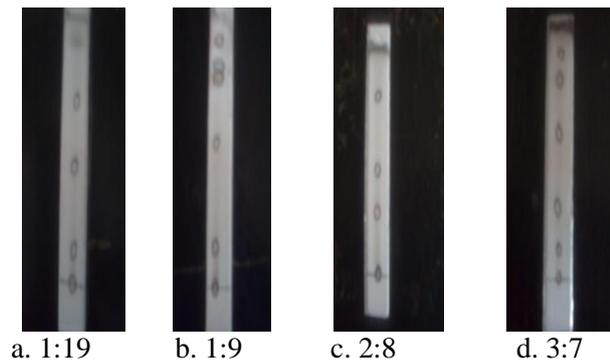
C. Hasil dan Pembahasan

1. Hasil Penelitian

Daun pare (*M. charantia*) yang diambil berasal dari Kabupaten Gowa Sulawesi Selatan pada bulan Januari 2009. Sampel daun pare yang telah dibersihkan, kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan, selanjutnya dipotong kecil-kecil hingga menjadi serbuk kasar. Berat Serbuk kasar daun pare yang diperoleh adalah 673,3 g.

Serbuk daun pare sebanyak 673,3 g dimaserasi dengan menggunakan n-heksana, kemudian dipisahkan dengan cara evaporasi hingga diperoleh ekstrak kental n-heksana berwarna hijau kekuningan sebanyak 8,3 g. Ekstrak kental n-heksana yang diperoleh kemudian diuji pendahuluan dengan pereaksi Liebermann-Burchard yang positif dengan senyawa terpenoid. Hal ini ditandai dengan terbentuknya warna merah setelah direaksikan dengan pereaksi LB.

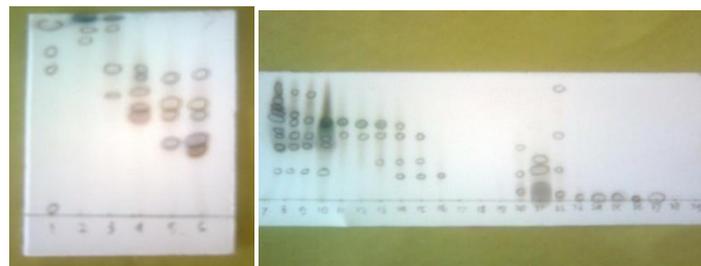
Ekstrak n-heksana yang diperoleh kemudian diuji kromatografi lapis tipis (KLT) dengan menggunakan eluen etilasetat-heksana dalam volume larutan 2 mL, dengan perbandingan 1:9, 1:19, 2:8, dan 3:7 dan hasil kromatogramnya dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Kromatogram Lapis tipis ekstrak n-heksana secara maserasi
 Eluen : etilasetat : heksana
 Adsorben : silika gel GF₂₅₄
 Penampak noda : H₂SO₄ 10%

Sebanyak 5 gram ekstrak n-heksana difraksinasi melalui kromatografi kolom cair vakum (vakum Liquid Chromatography, VLC) dengan menggunakan silika gel 60 H (15 gram, 5 cm x 5 cm) sebagai fasa diam dan eluen etilasetat:n-heksana sebanyak 50 mL sebagai fasa gerak yang ditingkatkan kepolarannya.

Pada proses fraksinasi ini diperoleh 30 fraksi. Ke-30 fraksi tersebut kemudian diuji KLT dengan eluen etilasetat-heksana dengan perbandingan 3 : 7 dan memberikan kromatogram seperti pada Gambar 2.

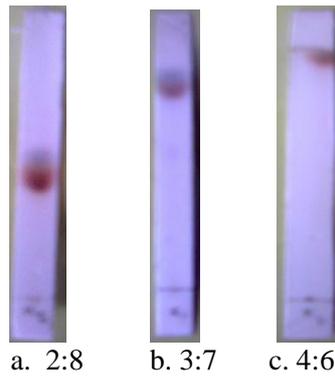


Gambar 2. Kromatogram Lapis Tipis Fraksi-Fraksi KKCVC
 Eluen: etilasetat-heksana
 Adsorben: silika gel GF₂₅₄
 Penampak noda: H₂SO₄ 10%

Fraksi-fraksi yang menunjukkan kromatogram yang sama pada Gambar 2 digabung hingga diperoleh tujuh fraksi gabungan, kemudian fraksi gabungan tersebut diuji dengan pereaksi warna Liebermann-Burchard.

Pada fraksi C, diperoleh kristal yang berwarna hijau dan berbentuk jarum. Kristal yang terbentuk kemudian dicuci dengan menggunakan pelarut n-heksana dan etil asetat. Kristal yang diperoleh berwarna putih berbentuk jarum

sebanyak 0,0047 g (4,7 mg). Kristal yang diperoleh kemudian diuji KLT dengan menggunakan eluen etil asetat: n-heksana = 2 : 8, dengan eluen etil asetat : n-heksana = 3 : 7, dengan eluen etil asetat : n-heksana 4 : 6. Dan, dari uji KLT ternyata kristal yang diperoleh belum murni yang ditandai dengan terbentuknya dua noda pada kromatogram yaitu bercak noda berwarna merah dan berwarna hijau.



Gambar 3. Kromatografi Lapis Tipis pada Fraksi C (Kristal)

Eluen: etilasetat-heksana

Adsorben: silika gel GF₂₅₄Penampak noda: H₂SO₄ 10%

Ekstrak kental n-heksana dari daun pare (*M. charantia*) yang diperoleh dilakukan uji bioaktivitas dengan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) dengan menggunakan larva udang *A.salina* dan diperoleh nilai LC₅₀ sebesar 91.84 ppm.

Ekstrak yang telah difraksinasi dengan KKCVC diperoleh 7 fraksi gabungan, kemudian dilakukan uji bioaktivitas. Uji bioaktivitas untuk ke-7 fraksi (A – G) terhadap larva udang *A.salina* L dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Nilai toksisitas (LC₅₀ dalam ppm) fraksi A – G terhadap larva udang *A. Salina*

No.	Fraksi	Pelarut	LC50 (ppm)	keterangan
1.	A	DMSO	38.26	Toksik
2.	B	DMSO	85.90	Toksik
3.	C	DMSO	94.45	Toksik
4.	D	DMSO	79.56	Toksik
5.	E	DMSO	92.53	Toksik
6.	F	DMSO	70.41	Toksik
7.	G	DMSO	92.69	Toksik

2. Pembahasan

Daun pare yang sudah dikeringkan dan dihaluskan menjadi serbuk kasar sebanyak 673.3 g dimaserasi dengan n-heksana pada suhu kamar selama 3 x 48 jam, yang bertujuan untuk mengekstrak kandungan senyawa kimia yang terdapat dalam daun pare hingga hasil perendaman terakhir tidak berarti lagi bagi kandungan kimianya. Hal ini ditandai dengan warna maserat yang bening pada maserasi terakhir. Pada proses maserasi menggunakan pelarut n-heksana karena memiliki tingkat kepolaran yang rendah, karena n-heksana tidak memiliki ikatan rangkap atau atom-atom elektronegatif, sehingga bersifat nonpolar, sehingga diharapkan senyawa-senyawa yang terdapat dalam daun pare dapat terekstrak yang memiliki tingkat kepolaran yang sama dengan n-heksan. Pertimbangan lain digunakannya pelarut

n-heksan adalah kemudahannya dipisahkan dari ekstrak dibandingkan jika menggunakan pelarut lain misalnya yang memiliki kepolaran hampir sama dengan n-heksan seperti sikloheksan. Hal tersebut berkaitan dengan titik didih pelarut yakni n-heksana dengan titik didih 68°C dan sikloheksana dengan titik didih 80,5°C. Titik didih yang tinggi untuk menghilangkan pelarut dapat juga merusak senyawa yang terekstraksi, terlebih terhadap senyawa yang memiliki titik didih yang rendah.

Evaporasi digunakan dalam memisahkan pelarut dengan ekstrak karena dengan evaporasi, pelarut yang dipisahkan dari ekstrak pada suhu rendah jauh di bawah titik didihnya sehingga senyawa yang mungkin ada dalam ekstrak dengan titik didih yang rendah tidak akan mengalami kerusakan hingga diperoleh ekstrak kental yang berwarna hijau kekuningan sebanyak 8,3 g.

Ekstrak kental n-heksana kemudian diuji pendahuluan dengan menggunakan pereaksi Liebermann-Burchard, hal ini dimaksudkan untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak n-heksana tersebut. Hasil dari uji pendahuluan ini bahwa ekstrak n-heksan ini positif terhadap pereaksi tersebut dimana ekstrak tersebut mengandung senyawa golongan terpenoid yang ditandai dengan terbentuknya warna merah setelah direaksikan dengan pereaksi LB.

Ekstrak n-heksan yang diperoleh kemudian diuji kromatografi lapis tipis (KLT) dengan menggunakan empat macam sistem eluen dengan perbandingan yang berbeda-beda. Uji KLT ini bertujuan untuk menentukan pelarut atau eluen yang cocok untuk digunakan pada proses kromatografi kolom cair vakum. Hasil analisis KLT menunjukkan bahwa eluen yang sesuai digunakan pada kromatografi kolom cair vakum adalah etilasetat : n-heksana (1:19) menunjukkan pemisahan noda yang jelas dan komponen terpisah baik dibandingkan dengan eluen lainnya setelah disemprot dengan asam sulfat 10% (Gambar 1), yang bertujuan untuk mendeteksi noda KLT. Kemampuan asam sulfat mengoksidasi gugus kromofor dari zat aktif simplisia sehingga noda menjadi tampak oleh mata.

Pada proses fraksinasi dilakukan dengan cara kromatografi kolom cair vakum (Vacum Liquid Chromatography, VLC) 5 g ekstrak kental difraksinasi dengan menggunakan silica gel G 60 H sebagai fasa diam dan fasa geraknya yaitu n-heksana, campuran etilasetat-n-heksana, dan etilasetat dengan kepolaran yang terus ditingkatkan, menghasilkan 30 fraksi. Penggabungan fraksi tersebut berdasarkan analisa KLT memberikan kromatogram seperti pada Gambar 2, yang menunjukkan pola fraksinasi yang baik ditunjukkan dengan pemisahan komponen-komponen senyawa pada kromatogram berdasarkan kepolaran dan harga Rfnya. Fraksi yang non polar menunjukkan banyak komponen senyawa yang teridentifikasi. Sedangkan pada fraksi polar komponen senyawa tidak tampak pada kromatogram karena terikat kuat pada silika. Peningkatan kepolaran diperlukan, sehingga memudahkan pemilihan fraksi yang akan digabung dengan melihat harga Rfnya.

Ke-30 fraksi tersebut dikelompokkan menjadi tujuh fraksi gabungan atas dasar kemiripan harga Rf-nya (Gambar 2). Ketujuh fraksi gabungan tersebut diuapkan pelarutnya hingga diperoleh padatan yaitu fraksi A berwarna Orange (0,60 g), fraksi B berwarna merah

kecokelatan (1,30 g), fraksi C berwarna hijau dan berbentuk seperti jarum (0,40 g), fraksi D berwarna hijau kehitaman (0,60 g), fraksi E berwarna kuning kehitaman (1,10 g), fraksi F berwarna kuning kehitaman (0,30 g), dan fraksi G berwarna kuning (0,30g).

Fraksi-fraksi gabungan tersebut kemudian diuji dengan pereaksi Liebermann-Burchard, fraksi A dan B mengandung golongan senyawa steroid, sedangkan fraksi C - G mengandung senyawa golongan terpenoid. Dari fraksi C diperoleh kristal berwarna hijau. Kristal yang terbentuk pada fraksi C, kemudian di cuci dengan menggunakan pelarut n-heksan dan etil asetat dan menghasilkan kristal berwarna putih dengan berat 0,0047 g (4,7 mg). Pencucian kristal dengan menggunakan etil asetat memberikan kristal jauh lebih putih dibandingkan dengan menggunakan n-heksan. Hal ini menandakan bahwa etil asetat dapat menarik senyawa-senyawa pengotor yang tidak dapat larut dalam n-heksan yang masih terdapat pada kristal dibandingkan dengan n-heksan yang hanya menarik senyawa-senyawa pengotor yang memiliki kepolaran yang sama dengan n-heksan dan memberikan kristal berwarna putih kekuningan.

Kristal putih dan berbentuk jarum yang diperoleh diuji kemurniannya dengan kromatografi lapis tipis yang menghasilkan dua noda pada kromatogram, hal ini berarti kristal tersebut masih perlu dimurnikan kembali dengan cara kristalisasi atau dengan kromatografi kolom flash, tetapi karena kristal yang diperoleh hanya 0,0047 g (4,7 mg), maka untuk melanjutkan ke tahap pemurnian tersebut dikhawatirkan kristal pada fraksi C tersebut akan habis. Selanjutnya, kristal ini diuji pereaksi Liebermann-Burchard menunjukkan warna merah, yang menandakan fraksi tersebut mengandung senyawa terpenoid. Hasil ini didukung dengan temuan yang dilakukan oleh Tarmudji (2004) yang menemukan terpenoid dari ekstrak n-heksan daun pare.

Ekstrak, fraksi (A-H) dan isolat yang dihasilkan dari daun pare mengandung senyawa golongan terpenoid dan steroid. Hal ini dapat dilihat untuk pengujian golongan steroid dan terpenoid menggunakan pereaksi yang sama yaitu pereaksi Lieberman Buchard, untuk mengidentifikasi adanya steroid atau terpenoid, dilihat dari perubahan warna yang tampak, positif steroid jika berwarna hijau sampai biru sedangkan positif terpenoid jika berwarna merah sampai ungu. Sehingga untuk ekstrak dan isolat senyawa metabolit sekunder yang dominan adalah senyawa golongan terpenoid sehingga diperoleh warna

merah. Hasil ini mengindikasikan bahwa daun pare banyak mengandung senyawa terpenoid baik dari segi kualitatif maupun jenisnya. Terbukti dari hasil fraksinasi yang dilakukan, diperoleh fraksi gabungan yang seluruhnya teridentifikasi senyawa terpenoid. Hal ini menunjukkan bahwa terpenoid terdiri dari beberapa jenis senyawa berdasarkan kelarutannya terhadap eluen yang digunakan.

Uji toksisitas dengan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) dilakukan sebagai uji pendahuluan untuk mengetahui bioaktivitas senyawa yang bersifat toksik. Dasar pengujian BSLT didasarkan pada kemampuan senyawa untuk mematikan larva udang. Masing-masing sampel dapat ditentukan efek toksisitasnya berdasarkan nilai LC_{50} dari perhitungan data kematian larva udang *A.salina* dengan menggunakan grafik probit log konsentrasi.

Hasil perhitungan LC_{50} menunjukkan bahwa ekstrak n-heksan daun pare berada dalam medium toxic dengan nilai LC_{50} sebesar 91.84 ppm. Kemudian dari hasil fraksinasi, diperoleh 7 fraksi gabungan yaitu fraksi A – G. Dari ke-7 fraksi tersebut memiliki nilai LC_{50} berturut-turut adalah 38.26 ppm, 85.90 ppm, 94.45 ppm, 79.56 ppm, 92.53 ppm, 70.41 ppm dan 92.69 ppm.

Dari data ke-7 fraksi tersebut terlihat bahwa fraksi yang memberikan respon yang paling toksik terhadap larva udang *A. salina* yaitu fraksi A dengan LC_{50} 38.26 ppm yang teridentifikasi mengandung senyawa steroid. Hal ini diindikasikan bahwa baik ekstrak maupun fraksi gabungan tersebut kemungkinan mengandung senyawa yang bersifat toksik. Hal ini berdasarkan teori yang menyatakan bahwa semakin kecil nilai LC_{50} yang dimiliki suatu ekstrak tanaman maka akan semakin toksik tanaman tersebut dan semakin berpotensi untuk memiliki aktifitas biologi atau efek farmakologi. Hal ini sesuai Harbone (1994), yang menyebutkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak, maka sifat toksiknya akan semakin tinggi.

Berdasarkan data LC_{50} baik dari ekstrak maupun fraksi gabungan dari daun pare tergolong toksik terhadap larva udang *A. salina*, mengindikasikan bahwa ekstrak dan fraksi gabungan dari ekstrak n-heksan daun pare mengandung senyawa yang bersifat bioaktif. Hasil ini didukung dengan penelitian yang dilakukan oleh Monitto (1991) melaporkan bahwa biji buah pare telah berhasil ditemukan senyawa α -momorcharin yang aktif sebagai anikanker. Sedangkan penelitian yang dilakukan oleh

Susannah Rita, dkk menyatakan bahwa ekstrak etanol dari buah pare (*M. charantia*) bersifat toksik terhadap larva udang *A. salina* dengan LC_{50} 230 ppm.

Dari data di atas yang menunjukkan toksisitas yang cukup tinggi terhadap larva udang *A.salina* baik pada ekstrak dan fraksi yang diperoleh, maka tanaman pare merupakan tanaman obat yang telah digunakan secara tradisional mengandung senyawa-senyawa bersifat bioaktif.

D. Kesimpulan

Isolasi yang dilakukan pada ekstrak n-heksan daun pare (*M.charantia*) ditemukan golongan senyawa terpenoid. Fraksi A-B hasil KKCVC teridentifikasi senyawa steroid, fraksi C-H mengandung terpenoid. Isolat yang diperoleh dari fraksi C mengandung senyawa terpenoid. Hal ini menghasilkan warna merah ketika direaksikan dengan pereaksi Liebermann-Burchard. Senyawa ini berupa kristal berbentuk jarum yang berwarna putih.

Hasil uji bioaktivitas ekstrak n-heksan daun pare terhadap larva udang *Artemia salina* Leach menunjukkan bahwa ekstrak dan ketujuh fraksi bersifat bioaktif terhadap benur udang *Artemia salina* Leach, ekstrak (terpenoid) LC_{50} sebesar 91.84 ppm. Fraksi A – B (steroid) dengan LC_{50} masing-masing 91,84 ppm; 38,26 ppm, dan fraksi C- G (terpenoid) dengan LC_{50} masing-masing adalah 85,90 ppm; 94,45 ppm, 79,56 ppm; 92,53 ppm; 70, 41; dan 92,69 ppm.

E. Daftar Pustaka

- Dinas Pertanian Jawa Timur. 2007. *Budidaya Pare (Momordica charantica L.)*. <http://www.dipertajati.go.id/2007/index>. Diakses 12 Maret 2009.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Mawuntyas, D; Dewi, J. 2006. *Nyamuk pun Tak Tahan Pahitnya Pare*. <http://anekaplanta.com/2007/12/22/nyamu-k-pun-tak-tahan-pahitnya-pare/>. Diakses 01 Desember 2008.
- Miranti, I. 1998. *Penentuan LC_{50} Ekstrak Metanol N-Heksan, N-Butanol dari Fraksi Air Spons (Cellyspongia.Sp) dengan Menggunakan Larva Udang Artemia salina*. Skripsi. FMIPA UNHAS. Ujung Pandang.

- Mulawarman, I.D. 2005. *Uji Bioaktif Senyawa Ekstrak Metanol Kulit Batang Tumbuhan Paliasa (Kleinhovia hospital Linn.) Pada Benur Udang (Artemia salina Leach)*. Skripsi. FMIPA UNM. Makassar
- Ramsis, Noval. 2008. *Pahit, Banyak manfaat*. <http://alfauzien.web.id/isi/2008/12/16/Pare>, Banyak Khasiat. Diakses 03 Januari 2009.
- Subahar, T. 2004. *Khasiat dan Manfaat Pare*. Agromedia Pustaka. Bandung.
- Sovia Lenny. 2006a. *Senyawa Flavonoida, Fenilprapanoida dan Alkaloida*. Departemen Kimia FMIPA USU. Medan.
- Tarmudji. 2004. *Daun pare Untuk Obat Cacing Lambung pada Domba*. <http://www.litbang.deptan.go.id/artikel/one/62/pdf/Daun%20Pare%20untuk%20Obat%20Cacing%20Lambung>. Diakses 01 Desember 2008.