

ISOLASI SENYAWA AKTIF DARI KAYU SECANG (*Caesalpinia sappan L.*) DAN PENGUJIANNYA TERHADAP PROLIFERASI SEL OSTEOLAS

Mukhriani¹, Subehan², Yusnita Rifa²

¹Jurusan Farmasi FIK UIN Alauddin Makassar

²Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin

Email : fm.tetty@gmail.com

ABSTRAK

Pengobatan tradisional mayoritas menggunakan obat herbal untuk mendukung kesehatan, salah satu tumbuhan yang digunakan sebagai obat tradisional adalah kayu secang. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi senyawa aktif dari kayu secang (*Caesalpinia sappan L.*) dan menentukan karakter senyawa aktif kayu secang berdasarkan data IR. Penelitian ini berdasarkan *bioassay guided isolation* pada setiap tahap pengerjaan. Karakterisasi senyawa aktif berdasarkan Kromatografi lapis tipis dengan berbagai penampak bercak dan data IR. Data karakteristik isolat aktif menggunakan analisis kualitatif deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi dan isolat kayu secang memiliki aktivitas terhadap proliferasi sel osteoblas. Ekstrak kayu secang difraksinasi dengan metode *sepacore flash chromatography*. Pada proses fraksinasi ini, eluen yang digunakan adalah n-heksan dan etil asetat. Hasil fraksinasi ekstrak etanol 70% berupa 6 fraksi gabungan yaitu fraksi 1-6. Berdasarkan profil kromatogram fraksi 4 merupakan fraksi yang menghasilkan nilai proliferasi osteoblas tertinggi dengan nilai viabilitas mencapai 200,00%. Disimpulkan bahwa fraksi 4 dan isolat memiliki senyawa yang dapat meningkatkan proliferasi sel osteoblas, isolat tersebut menunjukkan adanya gugus OH, CH alifatik, C-C siklik dan C=C aromatik berdasarkan data IR.

Kata kunci : Isolasi, kromatografi lapis tipis, *Caesalpinia sappan L.*

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara dengan kekayaan hayati terbesar yang memiliki lebih dari 30.000 spesies tanaman tingkat tinggi. Hingga saat ini tercatat 7000 spesies tanaman telah diketahui khasiatnya namun kurang dari

300 tanaman yang digunakan sebagai bahan baku industri farmasi secara reguler. WHO pada tahun 2008 mencatat bahwa 68% penduduk dunia masih menggantungkan sistem pengobatan tradisional yang mayoritas melibatkan

tumbuhan untuk menyembuhkan penyakit dan lebih dari 80% penduduk dunia menggunakan obat herbal untuk mendukung kesehatan mereka (Saifuddin, dkk., 2011).

Salah satu tumbuhan yang digunakan sebagai obat tradisional adalah kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.). Tumbuhan ini juga digunakan sebagai obat tradisional untuk pengobatan berbagai penyakit seperti diare, batuk berdarah, pembengkakan pada bagian tubuh tertentu. Penelitian tentang kandungan kimia terhadap tumbuhan ini telah dilakukan dan menunjukkan senyawa flavanoid (Nguyen, dkk., 2005) adalah senyawa yang paling banyak dikandung. Tanaman ini juga memiliki aktifitas sebagai antibakteri dan anti rematik dengan hasil yang sangat bagus (Shu, dkk., 2008)

Penelitian sebelumnya telah dilakukan standarisasi dan didapatkan ekstrak etanol yang menunjukkan hasil yang paling kuat dalam memproliferasi sel osteoblas (Subehan, dkk., 2012). Berdasarkan uraian diatas, maka dilakukan penelitian isolasi senyawa aktif untuk menentukan senyawa yang berkhasiat menstimulasi proliferasi osteoblas dari kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.).

Penelitian ini bertujuan mengisolasi senyawa aktif dari kayu secang dan menentukan karakter senyawa aktif yang berkhasiat sebagai stimulan pada proliferasi sel osteoblas. Penelitian ini

dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan sel osteoblas mencit (*Mus musculus*) yang berusia tiga sampai tujuh hari dimana tingkat proliferasi sel osteoblas ditentukan dengan pengukuran Elisa reader. Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi sumber acuan pengobatan tradisional khususnya sebagai antiosteoporosis.

METODE PENELITIAN

Lokasi dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilaksanagn di Laboratorium Biofarmaka Pusat Kegiatan Penelitian Universitas Hasanuddin. Desain penelitian ini adalah studi *eksperimental*.

Pengambilan dan Penyiapan Sampel

Sampel penelitian yang digunakan adalah kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) diperoleh dari Desa Talepu, Kecamatan Lilirilau, Kabupaten Soppeng. Sampel dibersihkan terlebih dahulu dengan cara mengupas korteks dan memotong menjadi bagian yang kecil. Kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) ditimbang sebanyak 180 gram dan diekstraksi secara sonikasi menggunakan cairan penyari etanol. Ekstrak etanol yang diperoleh kemudian dikumpulkan, dipekatkan dengan menggunakan rotavapor kemudian diliofilisasi sampai diperoleh ekstrak etanol kental.

Fraksinasi Komponen Kimia dengan Flash Chromatography

Sebelum menjalankan proses pembersihan dan separasi terlebih, metode yang akan digunakan diatur terlebih dahulu. Metode mencakup Flowrate, tipe rak penampung, volume tabung penampung, jenis kolom, tekanan, jenis dan gradien pelarut, serta waktu yang akan digunakan dalam proses pembersihan dan separasi.

Ekstrak etanol kayu secang difraksinasi menggunakan sepacore dengan campuran eluen n-heksan : etil asetat dengan gradien yang meningkat selama 55 menit. Tiap 2 gram dilarutkan dengan metanol, dicampurkan dengan silika, dan diuapkan. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam cartridge yang diisi dengan heksan. Fraksi-fraksi yang terkumpul pada tabung digabung berdasarkan *peak* yang tampak pada detektor. Diperoleh 6 fraksi gabungan (Fraksi 1-6) selanjutnya dilakukan KLT dengan eluen n-heksan : etil asetat (1:9) dan diuji aktivitas proliferasinya terhadap osteoblast.

Isolasi dan Pemurnian Senyawa Aktif

Fraksi 4.2.2 dari sepacore yang memiliki aktifitas tinggi terhadap osteoblast dilarutkan dengan etanol. Sampel ditotolkan secara berderet sehingga membentuk seperti pita dengan pipa kapiler pada lempeng kaca KLTP RP18 dan dielusi dengan metanol:air(4 : 6). Setelah terelusi, lempeng dilihat pada UV 254 nm dan 366 nm. Senyawa yang diperoleh dipisahkan dari silika gel dengan

cara disaring. Isolat yang diperoleh kemudian dikarakterisasi dengan menggunakan FT-IR .

Uji Aktivitas Proliferasi

Hewan uji yang digunakan yakni mencit (*Mus musculus*) yang berusia tujuh hari, bagian yang akan digunakan yaitu sel osteoblas yang terdapat dalam tulang parietal dengan cara kultur sel. Sel osteoblas dilepas dari botol kultur setelah kofluen. Sel dilepas dengan trypsin 0,5% 30 detik. Trypsin dinonaktifkan dengan penambahan larutan medium mengandung FBS 10%. Suspensi sel disentrifus dan endapan sel disuspensikan kembali dengan medium mengandung FBS 10%. Suspensi sel osteoblas dimasukkan masing-masing 200 µL kedalam sumuran mikroplate 96, kecuali untuk kontrol sel dan kontrol medium. Setelah itu sel diinkubasi dalam inkubator CO₂ selama 24 jam. Medium -MEM yang mengandung 10% FBS dikeluarkan diganti dengan -MEM yang tidak mengandung FBS sebanyak 200 µL ke dalam tiap sumuran mikroplate 96. Sel diinkubasi dalam inkubator CO₂ selama 24 jam. Data dikumpulkan dari hasil pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 630 nm dengan menggunakan Elisa reader. Data yang diperoleh dianalisis dan ditentukan presentasi proliferasi masing-masing perlakuan.

Analisis Data

Data karakteristik senyawa isolat aktif ekstrak *Caesalpinia sappan* meliputi

gugus fungsi berdasarkan bilangan gelombang hasil uji spektrofotometer infra red (IR) menggunakan analisis kualitatif deskriptif, dan data aktivitas proliferasi isolat murni dianalisis menggunakan metode kuantitatif-deskriptif dengan mengukur presentasi proliferasi masing-masing perlakuan.

HASIL PENELITIAN

Hasil ekstraksi sampel

Penelitian ini menggunakan kayu secang dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Dari penelitian hasil ekstraksi dari 2000 gram kayu secang dengan pelarut etanol 70% diperoleh ekstrak 148,09 gram.

Hasil Fraksinasi dengan sepacore

Tabel 1 memperlihatkan fraksinasi dengan menggunakan sepacore® menghasilkan 6 fraksi yaitu fraksi 1 bobot fraksi 2,09 gram, fraksi 2 bobot fraksi 4,84 gram, fraksi 3 bobot fraksi 9,19 gram, fraksi 4 dengan bobot fraksi 14,80 gram, fraksi 5 dengan bobot fraksi 1,40 gram dan fraksi 6 dengan bobot fraksi 3,82 gram.

Tabel 2 memperlihatkan Refraksinasi I (fraksi 4) yang diperoleh difraksinasi kembali dan diperoleh fraksi berdasarkan puncak-puncak yang muncul dari profil kromatogram dengan bobot fraksi sebagai berikut : F4.1 dengan bobot fraksi 1,68 gram, F4.2 dengan bobot fraksi 1,06 gram, F4.3 dengan bobot fraksi 1,02

gram, F4.4 dan F4.5 masing masing 0,16 gram dan 1,09 gram.

Tabel 3 memperlihatkan Refraksinasi II (fraksi 4.2) difraksinasi kembali dan diperoleh 6 fraksi (F4.2.1 – F4.2.6) dengan bobot fraksi masing-masing 0,003 gram, 0,19 gram, 0,12 gram, 0,11 gram, 0,10 gram dan 0,11 gram.

Hasil pengujian aktivitas proliferasi sel

Tabel 4 memperlihatkan bahwa fraksi 4 merupakan fraksi yang memiliki nilai viabilitas tertinggi terhadap proliferasi sel osteoblast yaitu mencapai 200%. Sedangkan isolatnya memiliki aktifitas terhadap sel osteoblas dengan menunjukkan viabilitas sel mencapai 47,22%.

Hasil karakterisasi isolat aktif

Tabel 5 memperlihatkan hasil karakterisasi IR terhadap isolat yang diperoleh dari fraksi menunjukkan adanya gugus OH, CH alifatik, C-C siklik dan C=C aromatik.

PEMBAHASAN

Penelitian ini menunjukkan kerja dari senyawa aktif kayu secang dalam menstimulasi proliferasi osteoblas sel. Pada penelitian sebelumnya, dilakukan ekstraksi kayu secang dengan variasi konsentrasi dan pelarut. Penelitian tersebut menyimpulkan bahwa ekstrak etanol 70% memiliki aktivitas proliferasi yang paling bagus dengan konsentrasi 0,01% (Subehan dkk, 2012). Pada penelitian ini tidak dilakukan variasi konsentrasi karena

pada konsentrasi yang sama, setiap fraksi mempunyai kekuatan yang sama, yang berbeda adalah aktivitasnya terhadap proliferasi sel osteoblas dan aktivitas tersebut dapat diukur.

Aktivitas terhadap proliferasi sel osteoblas digunakan sebagai *bioassay guided isolation* untuk memperoleh senyawa aktif yang berpotensi sebagai antiosteoporosis. Setiap tahap pemisahan senyawa dimonitor menggunakan KLT dan aktivitas proliferasi sel osteoblas diamati hingga didapatkan isolat aktif. Isolasi senyawa aktif dilakukan menggunakan kromatografi flash sepacore dilanjutkan dengan kromatografi lapis tipis preparatif. Karakterisasi senyawa antiosteoporosis ditentukan berdasarkan sifat fisikokimia dan data spektroskopi isolat aktif.

Pengujian skrining aktivitas antiosteoporosis dilakukan secara *in vitro*, yaitu pengujian zat uji terhadap proliferasi sel osteoblas. Efek proliferasi dinyatakan berdasarkan nilai persen viabilitas sel osteoblas. Persen viabilitas diperoleh dengan menghitung aktivitas metaboliknya melalui inkubasi sel dengan garam tetrazolium MTT. Sel yang bertanggung jawab untuk pembentukan tulang disebut osteoblas sedangkan osteoklas bertanggung jawab untuk penyerapan tulang (Jilka nL., 2001). Pembentukan dan penyerapan tulang berada dalam keseimbangan pada individu berusia sekitar 30-40 thn. Pada proses

osteoporosis akan terjadi abnormalitas bone turnover yaitu proses penyerapan tulang lebih banyak dari pada proses pembentukan tulang. (Manolagos SC., 1995). Dalam penelitian ini digunakan sel osteoblas sebagai sel uji karena sel tersebut bertanggung jawab untuk sintesis dan deposisi matriks tulang dalam proses remodeling tulang (U Kini dkk, 2012). Kontrol positif natrium florida dan kalsitonin berfungsi untuk membandingkan aktivitas proliferasi oleh golongan obat standar.

Kayu secang segar terlebih dahulu diangin-anginkan hingga kadar air berkurang dengan tujuan menghentikan proses enzimatik yang dapat merusak zat aktif. Selain itu untuk mencegah pertumbuhan mikroorganisme pada simplisia. Sampel yang telah kering diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan gelombang ultrasonik (proses ekstraksi tanpa pemanasan). Metode ini cocok untuk senyawa yang tidak stabil terhadap pemanasan karena dengan pemanasan diperkirakan dapat merusak senyawa kimia yang terdapat dalam sampel. Metode ekstraksi dengan menggunakan gelombang ultrasonik lebih dikenal dengan ekstraksi dengan sonikasi. Metode ini memanfaatkan gelombang ultrasonik yang dapat mempercepat waktu kontak antara sampel dan pelarut sehingga menyebabkan perpindahan zat aktif yang ada dalam sel tanaman ke pelarut menjadi lebih cepat. Ultrasonikasi ini bekerja

dengan memberikan tekanan mekanik pada sel sehingga menghasilkan rongga pada sampel. Kerusakan sel dapat mempercepat proses ekstraksi. Pelarut yang digunakan adalah etanol 70%.

Hasil pemisahan dari ekstrak etanol berupa 6 fraksi gabungan, yaitu fraksi 4-6. Masing-masing fraksi diuji terhadap sel osteoblast dan dibandingkan dengan kontrol positif dan ekstrak awal. Berdasarkan pengujian tersebut, fraksi 4 merupakan fraksi yang menghasilkan nilai proliferasi osteoblast tertinggi. Nilai viabilitasnya mencapai 200,00%. Nilai ini lebih tinggi dari kontrol positif natrium florida dan klasitonin yang hanya mempunyai viabilitas 100,00% dan 91,67%. Hal ini mengindikasikan bahwa fraksi 4 memiliki senyawa yang kemungkinan dapat meningkatkan proliferasi osteoblas.

Fraksi 4 direfraksinasi menggunakan sepacore dengan campuran eluen air:metanol (6:4). Tiap 1 gram dilarutkan dengan eluen, dicampur dengan silika RP18, dan diuapkan. Fraksi-fraksi yang terkumpul pada tabung digabung berdasarkan *peak* yang tampak pada detektor. Diperoleh 5 fraksi gabungan (fraksi 4.1-4.5) selanjutnya dilakukan KLT dengan heksan:etil asetat (3:7). Berdasarkan profil KLT, Fraksi 4.2 merupakan fraksi yang berpotensi untuk direfraksinasi. Tiap 1 gram dilarutkan dengan etil asetat dan dicampur dengan

silika, kemudian diuapkan. Fraksi-fraksi yang terkumpul pada tabung digabung berdasarkan *peak* yang tampak pada detektor. Diperoleh 6 fraksi gabungan (fraksi 4.2.1-4.2.6). Berdasarkan profil KLT, fraksi 4.2.2 merupakan fraksi yang berpotensi untuk dilakukan KLTP. KLTP dilakukan dengan RP18 dan dielusi dengan metanol:air (4:6) sehingga diperoleh beberapa pita yang tampak kemudian dikeruk dengan spatula dan dikumpulkan.

Uji potensi aktivitas antiosteoporosis dilakukan terhadap salah satu isolat yang diperoleh. Isolat tersebut dipilih berdasarkan profil KLT. Isolat yang dipilih adalah isolat yang memiliki konsentrasi tertinggi dalam fraksi. Isolat tersebut dikarakterisasi dengan FT-IR. Identifikasi dengan FT-IR menunjukkan bahwa adanya pita serapan pada gelombang 3682,96 yang merupakan gugus O-H yang biasanya muncul pada bilangan gelombang 3600-3300 cm^{-1} . Pita serapan pada gelombang 2920,34 cm^{-1} menunjukkan gugus C-H alifatik. Gugus C-C siklik ditunjukkan oleh adanya serapan dengan intensitas yang lemah pada daerah 1500,25 cm^{-1} dan 1451,18 cm^{-1} . Alkena biasanya terabsorpsi pada bilangan gelombang 1600 cm^{-1} . Salah satu spektra isolat tersebut menunjukkan 1615,25 cm^{-1} . Karakterisasi isolat KS1, berdasarkan klt dengan berbagai reagen penampak bercak menunjukkan bahwa isolat KS1 merupakan

senyawa flavanoid. Isolat yang diperoleh diuji aktivitasnya terhadap osteoblas. Isolat tersebut memiliki persen viabilitas sel mencapai 47,22%. Hal ini mengindikasikan bahwa isolat masih memiliki efek proliferasi terhadap sel.

KESIMPULAN

Fraksi dan isolat kayu secang dapat menstimulasi proliferasi sel osteoblas berdasarkan data viabilitas sel, yaitu fraksi 4 dan isolatnya. Fraksi 4 merupakan fraksi yang memiliki nilai viabilitas tertinggi terhadap proliferasi sel osteoblas, yaitu mencapai 200,00%. Sedangkan isolatnya juga memiliki aktifitas terhadap sel osteoblas dengan menunjukkan viabilitas sel mencapai 47,22%.

Karakterisasi isolat KS1, berdasarkan klt dengan berbagai reagen penampak bercak dan data IR menunjukkan bahwa isolat KS1 merupakan senyawa flavanoid dengan gugus CH alifatik, C-C siklik dan C=C aromatik.

KEPUSTAKAAN

- Alan R. Gaby MD. (2005). *Osteoporosis: Natural Solutions*. Vitality Magazine. Kanada: The Wire Inc.
- Setiyohadi.(2000). *Osteoporosis Akibat Steroid*, Grup PT Kalbe Farma, Jakarta, hal 28.
- Subehan, Rifai,Y.,Mufidah. (2012). *Standarisasi Ekstrak Kayu*

Jilka RL. Juni. (2002). *Cell biology of osteoclast and osteoblast and the hormones and cytokines that control their development and activity*. The 1st Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The European calcified Tissue Society CME.

Kini U & Nandeesh BN.(2012). *Chapter 2: Physiology of Bone Formation, remodelling, and metabolism*. Berlin: Springer-Verlag. Hal. 44-46.

Manolagas SC, and Jilka RL. Feb .(1995). *Bone Marrow, Cytokines, and Bone Remodeling Emerging Insights into the Pathophysiology of Osteoporosis*. N Engl J Med 332(2). hal. 305-11

Nguyen MT., Awale S., Tezuka Y., Tran QL., Kadota S.(2005). *Xanthin oxidase inhibitors from heartwood of Vietnamese Caesalpinia sappan*. Chem Pharm Bull 53(8).

Shu hui shi. (2008). *A New Flavanoid from Heartwood of Caesalpinia sappan*. China journal of Chinese materia medica.Hal 903-5

Secang dan Pengujiannya terhadap Proliferasi Sel Osteoblas.

Saifuddin A, Rahayu, Yuda Hilwan.(2011).
Standarisasi Bahan Obat Alam.
Graha Ilmu. Yogyakarta. hal. 1-22.

Yatim F.(2003). *Osteoporosis: Penyakit
Kerapuhan Tulang pada Manula*.
Jakarta: Pustaka Populer Obor.

Tabel 1. Fraksinasi Ekstrak Awal

Fraksi	Bobot Fraksi
F1	2,09 gram
F2	4,84 gram
F3	9,19 gram
F4	14,80 gram
F5	1,40 gram
F6	3,82 gram

Tabel 2. Refraksinasi I (Fraksi 4)

Fraksi	Bobot Fraksi
F4.1	1,68 gram
F4.2	1,06 gram
F4.3	1,02 gram
F4.4	0,16 gram
F4.5	1,09 gram

Tabel 3. Refraksinasi II (Fraksi 4.2)

Fraksi	Bobot Fraksi
F4.2.1	0,003 gram
F4.2.2	0,19 gram
F4.2.3	0,12 gram
F4.2.4	0,11 gram
F4.2.5	0,10 gram
F4.2.6	0,11 gram

Tabel 4. Hasil Pengujian Aktivitas Proliferasi Sel

Perlakuan	% viabilitas ± S
K.s	100,00% ± 0,003
K.m	0,00% ± 0,004
NAF	100,00% ± 0,002
C	91,67% ± 0,002
E	91,67% ± 0,0007
Fr.1	27,78% ± 0,000
Fr.2	25,00% ± 0,003
Fr.3	116,67% ± 0,0007
Fr.4	200,00% ± 0,002
Fr.5	11,11% ± 0,009
Fr.6	11,11% ± 0,003
Isolat	47,222% ± 0,005

Ket: K.s : Kontrol sel

K.m : Kontrol medium

NAF : Natrium Florida

C : Kalsitonin

E : Ekstrak awal

Fr. : Fraksi

A : Absorbansi

Tabel 5. Data spektrum IR isolat KS

Bilangan gelombang (cm ⁻¹)	Bentuk pita	Intensitas	Kemungkinan fungsi	gugus
3682,96	Lebar	medium	O-H	
2930,43	Lebar	medium	C-H alifatik (strech)	
1615,25	Lebar	lemah	C=C alkena/aromatik	
1500,25	Lebar	lemah	C-C siklik	
1451,18	Lebar	lemah	C-C siklik	