

SKRINING SENYAWA BIOAKTIF DARI BEBERAPA EKSTRAK TUMBUHAN ASAL KAWASAN HUTAN KALIMANTAN TENGAH DAN ISOLASI SENYAWA BIOAKTIF *Fibraurea chloroleuca* Miers

*Bioactive Compound Screening from Some Plants Extract from Middle Kalimantan Forest and Bioactive Compound Isolation *Fibraurea chloroleuca* Miers.*

Jusain Setiadi¹ dan Subagus Wahyuono²

Program Studi Ilmu Farmasi
Sekolah Pascasarjana Universitas Gadjah Mada

ABSTRACT

Indonesia is known for its largest biodiversity on the world. However, up to now they have not been studied completely for their utilization and development especially as drug resources. Bioactive screening on 14 extracts (chloroform and methanol extracts of medicinal plants) using Brine Shrimp Lethality (BST, using larvae *Artemia salina*) assay (500 and 1000 $\mu\text{g/ml}$) gave 17 extracts potential (100% larvae death) to be developed as bioactive compounds resources. Further screening of these 17 extracts at a lower dose (100 $\mu\text{g/ml}$), 10 extracts (100% larvae death) were obtained. One of those extracts is chloroform extracts of # 03 bfar 029 identified as *Fibraurea chloroleuca* Miers.

Bioassay (BST) guided isolation of *F. chloroleuca* extract, the most toxic isolate (b1) was obtained (LC_{50} , 4.5 $\mu\text{g/ml}$). The isolate (b1) at the highest tested dose (500 $\mu\text{g/ml}$) inhibited 20,08% of the growth of HeLa cell *in vitro*.

Isolate (b1) appears as orange powder, having melting point at 182.3-183.0°C and λ_{max} (CHCl_3) at 241 and 345 nm. Based on TLC pictured visualized by Dragendorff, b1 is confirmed as an alkaloid. Mass spectrum (EIMS) data of b1 showed the highest mass peak at m/z 351 (75%). The odd mass number strengthens the conclusions that b1 is an alkaloid having odd number of -N- atom. The IR spectrum (KBr) indicates the present -OH, =CH, -CH, and C=C-C=O, secondary amine functional groups, in addition aromatic ring absorption band is also observed.

Keywords : *Fibraurea chloroleuca* Miers., bioactive, BST, HeLa cell

¹ Candi Simping 40 Mulyosari, Banyuwangi.

² Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada

PENGANTAR

Dewasa ini penggunaan bahan alam sebagai sumber bahan baku dalam bidang farmasi semakin meluas. Indonesia merupakan negara terkaya di dunia ditinjau dari biodiversitas tumbuhan melampaui negara Brasil yang mempunyai hutan terluas didunia. Diperkirakan di seluruh bumi terdapat 40.000 spesies tumbuhan, dimana 30.000 spesies tumbuhan hidup di kepulauan Indonesia. Di Indonesia kurang lebih 75% dari seluruh kawasan hutan belum dimanfaatkan secara optimal sebagai salah satu bahan baku obat dari alam¹.

Brine Shrimp Lethality Test (BST), merupakan salah satu model bioassay skrining terhadap keberadaan senyawa aktif ataupun ekstrak aktif dari bahan alam². Telah dilaporkan bahwa 17 ekstrak dari 70 tumbuhan³ (140 ekstrak; 70 ekstrak metanol dan 70 ekstrak kloroform) asal Kalimantan Tengah mempunyai toksisitas cukup tinggi terhadap *A. salina* dimana mengakibatkan 100% kematian pada konsentrasi 500 µg/mL.

Tujuan penelitian ini adalah melakukan skrining terhadap 17 ekstrak aktif dari tumbuhan asal kawasan hutan Kalimantan Tengah dengan metode *bioassay guided isolation* dengan BST sebagai model serta mengisolasi senyawa bioaktif dari ekstrak aktif. Selain itu juga menentukan LC₅₀ senyawa bioaktif (*A. salina*) serta sitotoksitas (IC₅₀) terhadap sel HeLa dan melakukan karakterisasi struktur isolat dengan menggunakan data spektroskopi UV, IR, dan MS.

CARA PENELITIAN

Alat untuk kromatografi adalah alat kromatografi pada umumnya, silika gel GF₂₅₄ (E. Merck) dan fase gerak yaitu n-heksana, kloroform, eter, amoniak, etil asetat, toluen, kloroform dan metanol dengan perbandingan tertentu.

Alat untuk uji toksisitas adalah mikropipet, flakon, alat-alat untuk menetasakan *A. salina* L., lampu (40 watt), aerator, *micro syringe*. Alat untuk uji sitotoksik: inkubator, sentrifuse, tube penumbuh sel, ELISA reader, mikroskop, kamera digital, pipet *multichannel*, 96 well plates. Bahan untuk uji sitotoksik yaitu sel HeLa (sel kanker rahim), DMSO, media RPMI-1640 (1-glutamin), fetal bovin serum (FBS), fungison 0,5%, dan MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide).

Alat untuk spektrometri yang digunakan spektrometer UV-vis (Milton Roy Spectronic 3000), IR (Shimadzu FTIR-8201PC) dan MS (Shimadzu QP-500).

CARA PENELITIAN

Berdasarkan penelitian terhadap 70 tumbuhan asal Kalimantan Tengah yang dikoleksi telah dilakukan uji toksisitas dengan metode BST pada konsentrasi 1000 $\mu\text{g/ml}$ dan 500 $\mu\text{g/ml}$ sebagai konsentrasi uji skrining³. Pada dosis terkecil yaitu 500 $\mu\text{g/ml}$, 17 ekstrak mempunyai prosentase kematian 100% terhadap larva *A. salina*, sehingga penelitian ini melakukan uji toksisitas dari 17 ekstrak aktif dengan menurunkan konsentrasi uji BST.

Pemilihan metode fraksinasi yang sering digunakan adalah metode yang didasarkan pada kelarutan senyawa yang akan dipisahkan⁴. Kromatografi vakum kolom digunakan untuk pemisahan lebih lanjut senyawa yang terkandung dalam fraksi aktif sehingga diperoleh fraksi dengan senyawa-senyawa yang lebih sederhana, hal ini akan memudahkan dalam mengisolasi senyawa yang kita inginkan. Fraksi-fraksi yang mempunyai toksisitas terhadap *A. salina* dapat dimurnikan lebih lanjut dengan kromatografi lapis tipis preparatif. Metode uji toksisitas yang digunakan dalam penelitian adalah metode BST, yaitu suatu uji ketoksikan terhadap larva udang *A. salina* dengan menghitung jumlah/prosentase kematian larva udang seperti yang digunakan oleh Meyer, dkk.², Meyer, dkk.², menyatakan bahwa suatu senyawa dikatakan toksik jika mempunyai nilai LC_{50} dibawah 1000 $\mu\text{g/ml}$. Aktivitas sitotoksik isolat yang diperoleh diuji terhadap sel HeLa dengan metode MTT.

Karakterisasi struktur senyawa aktif ditentukan dengan interpretasi data spektra yang diperoleh dengan menggunakan spektra UV, IR, dan MS^{4, 5}.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Skrining Senyawa dengan BST

Penelitian ini melakukan skrining menggunakan uji toksisitas dengan metode BST terhadap 17 ekstrak aktif dari 70 tumbuhan asal Kalimantan Tengah yang dikoleksi dengan menurunkan konsentrasi uji BST. Dari penurunan konsentrasi uji BST tersebut, diperoleh 10 ekstrak dengan kematian 100% pada konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$ terhadap *A. salina* (Tabel 1).

Sampel dengan kode 03 bfar 029 (CHCl_3) merupakan salah satu ekstrak aktif terhadap larva *A. salina*, dengan kematian 100% pada konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$.

Tabel 1. Prosentase kematian 100% terhadap larva *A. salina* pada konsentrasi 100 µg/ml masing-masing ekstrak.

No.	Sampel	Ekstrak
1.	03 bfar 027	CHCl ₃
2.	03 bfar 029	CHCl ₃
3.	03 bfar 066	CHCl ₃
4.	03 bfar 068	CHCl ₃
5.	03 bfar 068	MeOH
6.	03 bfar 023	MeOH
7.	03 bfar 023	CHCl ₃
8.	03 bfar 061	CHCl ₃
9.	03 bfar 058	CHCl ₃
10.	03 bfar 004	CHCl ₃

B. Tumbuhan *Fibraurea chloroleuca* Miers.

Hasil determinasi menyatakan tumbuhan 03 bfar 029 yang diteliti adalah tumbuhan *Fibraurea chloroleuca* Miers. (kayu kuning).

Tumbuhan ini banyak tumbuh di daerah hutan hujan dengan ketinggian kurang dari 1000 m diatas permukaan laut (dpl) dan banyak ditemukan di daerah Thailand, Vietnam, Sabah, Kalimantan, Sulawesi dan Maluku (Sitepu, 2001). Dari informasi pengobat tradisional masyarakat Dayak dan beberapa masyarakat, rebusan tumbuhan ini sering digunakan sebagai obat sakit perut, obat tetes mata serta sakit kuning^{6,7}.

C. Isolasi dan Uji Toksisitas Senyawa Aktif dengan BST

1. Partisi cair-cair ekstrak aktif

Ekstrak kloroform (41 g) dipartisi dengan n-heksana. Senyawa yang diperoleh ditampung dalam cawan porselen yang berbeda dan dianginkan pada suhu kamar.

Hasil uji BST diperoleh bahwa fraksi larut n-heksana mempunyai prosentase kematian lebih tinggi dibandingkan dengan fraksi tidak larut n-heksana pada konsentrasi 100 µg/ml yaitu 96% sedangkan pada fraksi tidak larut n-heksana hanya mempunyai harga 72% (Tabel 2).

Tabel 2. Persentase kematian larva *A. salina* dari fraksi larut dan tidak larut n-heksana pada konsentrasi 100 µg/ml.

No	Sampel	(%) Kematian
1.	Larut n-heksana	96
2.	tidak larut n-heksana	72

2. Fraksinasi kromatografi kolom vakum

Sebanyak 3 g fraksi larut n-heksana dielus sampel dengan fase gerak dilakukan secara bertahap pada kolom, dimulai dengan menggunakan n-heksana 100%, kemudian berturut-turut perbandingan antara n-heksana dan etil asetat ; 50:10, 40:20, 30:30, 20:40, 15:45, 10:50, 5:55, kloroform 100%, etil asetat 100% dan terakhir menggunakan kloroform: metanol (1:1) untuk melarutkan senyawa-senyawa yang masih tersisa, fraksi yang mempunyai kesamaan profil KLT digabung menjadi satu.

Hasil uji toksisitas pada fraksi-fraksi gabungan menunjukkan bahwa fraksi II merupakan fraksi teraktif terhadap larva *A. salina* pada konsentrasi 50 µg/ml.

Tabel 3. Persentase kematian larva *A. salina* dari fraksi gabungan hasil kromatografi kolom vakum pada konsentrasi 50 µg/ml.

No.	Sampel	(%) Kematian
1	F I	42
2	F II	88
3	F III	62
4	F IV	5
5	F V	52

Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan pelarut yang tidak saling melarutkan yang ditempatkan pada corong pisah. Fraksi II sebanyak 9 g dilarutkan dalam pelarut dengan komposisi n-heksana : metanol : air dengan perbandingan 4:2:0,5 v/v. Pada corong pisah akan terlihat adanya dua lapisan, yaitu lapisan atas merupakan senyawa yang terlarut dalam fase nonpolar (pelarut n-heksana) serta lapisan bagian bawah yang mengandung senyawa-senyawa yang relatif lebih polar (metanol).

Setiap fraksi kering yang diperoleh kemudian diuji aktivitas dengan metode BST pada konsentrasi 50 µg/ml.

Tabel 4. Prosentase kematian larva *A. salina* dari fraksi II atas dan bawah hasil partisi 3 macam pelarut pada konsentrasi 50 µg/ml

No.	Fraksi	(%) Kematian
1	Atas	20
2	Bawah	94

3. Isolasi dan uji BST senyawa aktif.

Ekstrak kering lapisan bawah fraksi II, ditotolkan pada lempeng KLT preparatif (20x20 cm) menggunakan fase diam silika gel 60 PF₂₅₄ (Merck).

Berdasar analisa menggunakan KLT bercak yang muncul pada KLT dengan fase gerak n-heksana : etil asetat (2:1 v/v) adalah tunggal dari ke tiga isolat. Hal ini memberikan informasi bahwa hasil KLT preparatif yang dilakukan memberikan hasil 3 isolat yang relatif murni.

Tabel 5. Prosentase kematian larva *A. salina* dari isolat hasil KLT preparatif pada konsentrasi 20 µg/ml

No.	Isolat	(%) Kematian
1	a	68
2	b	88
3	c	6

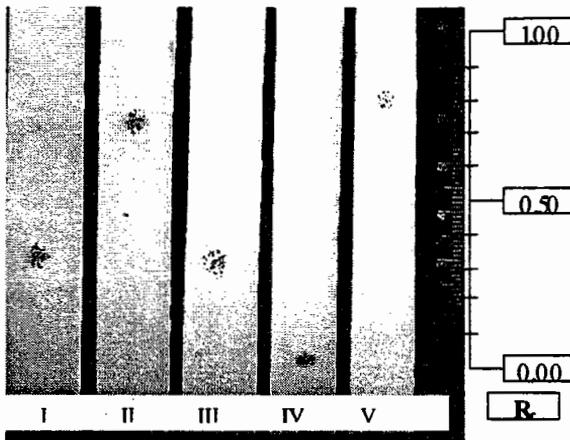
4. Uji kemurnian isolat b.

Isolat aktif (isolat b) terdiri dari 2 isolat, yaitu isolat b1 dan b2, kemudian masing-masing isolat dilakukan uji BST dengan konsentrasi yang lebih kecil, yaitu 10 µg/ml. Pada Tabel 6 terlihat prosentase kematian larva dari isolat b1 dan b2.

Tabel 6. Prosentase kematian larva *A. salina* isolat b1 dan b2 pada konsentrasi 10 mg/ml.

No.	Isolat	(%) Kematian
1	b1	91
2	b2	79

Uji kemurnian isolat b1 menggunakan 5 sistem fase gerak dengan komposisi ; I: toluen : etil asetat (1:0,5 v/v), II: kloroform : etil asetat (3:1 v/v) III: n-heksana : etil asetat (1:1 v/v), IV: kloroform : n-heksana (1:1 v/v) dan V: kloroform : eter (1:1 v/v).



Gambar 1. Kromatogra KLT uji kemurnian isolat menggunakan 5 sistem pelarut yaitu I: toluen : etil asetat (1:0,5 v/v), II: kloroform : etil asetat (3:1 v/v), III: n-heksana : etil asetat (1:1 v/v), IV: kloroform : n-heksana (1:1 v/v), dan V: kloroform : eter (1:1 v/v) dengan pereaksi Cerium (IV) Sulfat pada fase diam silika gel GF₂₅₄

Harga R_f isolat b1 dengan 5 sistem fase gerak yang berbeda, masing-masing: harga R_f tertinggi (0,81) terdapat pada sistem V (kloroform : eter (1:1 v/v)) sedangkan yang terendah pada sistem IV (kloroform : n-heksana (1:1 v/v)) dengan harga R_f 0,13 (Tabel 7).

Tabel 7. Harga R_f uji kemurnian isolat menggunakan 5 sistem pelarut yaitu I: toluen : etil asetat (1:0,5 v/v), II: kloroform : etil asetat (3:1 v/v), III: n-heksana : etil asetat (1:1 v/v), IV kloroform : n-heksana (1:1 v/v) dan V: kloroform : eter (1:1 v/v) dengan pereaksi Cerium (IV) Sulfat

No.	fase gerak	nilai R _f	pereaksi Ce(SO ₄) ₂
1	I	0,38	coklat-kehitaman
2	II	0,75	coklat-kehitaman
3	III	0,38	coklat-kehitaman
4	IV	0,13	coklat-kehitaman
5	V	0,81	coklat-kehitaman

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa isolat b1 hasil KLT preparatif relatif murni yang ditandai munculnya satu bercak pada profil KLT dengan berbagai sistem fase gerak yang dideteksi dengan Cerium (IV) Sulfat (Gambar 1).

5. Perhitungan LC_{50}

Selanjutnya dilakukan beberapa seri konsentrasi pada senyawa b1 dengan konsentrasi 15 $\mu\text{g/ml}$ hingga 1 $\mu\text{g/ml}$ untuk menentukan harga LC_{50} pada uji BST. Tabel 8 menunjukkan harga LC_{50} dari isolat b1 sebesar 4,5 $\mu\text{g/ml}$ sehingga isolat tersebut dapat dikatakan mempunyai toksisitas yang cukup tinggi terhadap larva *A. salina*.

Tabel 8. Prosentase kematian larva *A. salina* dari isolat b1 pada konsentrasi 15, 10, 5 dan 1 $\mu\text{g/ml}$ dan harga LC_{50} .

No.	Konsentrasi $\mu\text{g/ml}$	(%) Kematian	LC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
1	15	77	4,5
2	10	65	
3	5	47	
4	1	23	

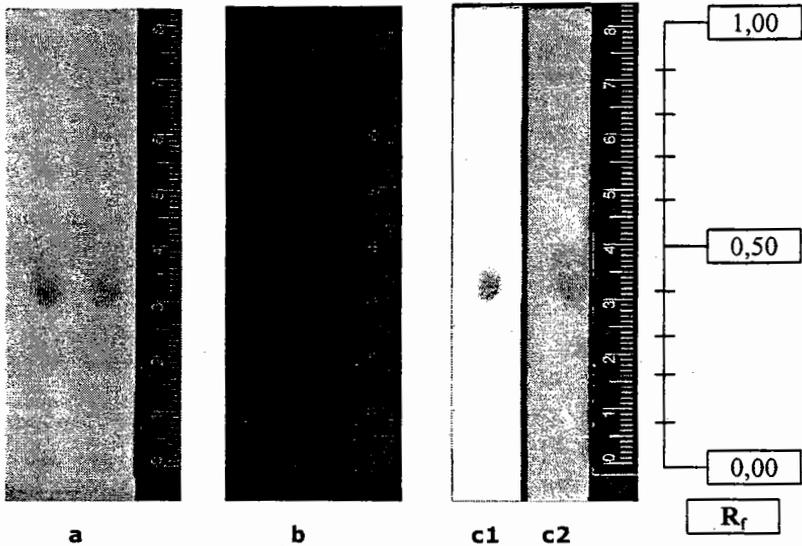
D. Uji Sitotoksitas Isolat b1 pada Sel HeLa

Efek sitotoksik isolat b1 terhadap sel HeLa pada konsentrasi terbesar, yaitu 500 $\mu\text{g/ml}$ memberikan hasil sebesar 20,08 %, begitu pula pada kultur sel dengan pemberian sampel sebesar 0,34 $\mu\text{g/ml}$ (konsentrasi terkecil), morfologi sel mempunyai kesamaan dengan morfologi sel pada kontrol sel HeLa. Hal ini berarti pada konsentrasi terkecil tersebut, efek sitotoksik pada dari isolat b1 sangat kecil.

E. Karakterisasi Senyawa Isolat b1

Isolat b1 (LC_{50} : 4,5 $\mu\text{g/ml}$ pada BST) yang telah diisolasi kemudian diidentifikasi golongan senyawanya menggunakan metode KLT.

Pada Gambar 2 menunjukkan bahwa isolat b1 merupakan golongan senyawa alkaloid, hal ini ditunjukkan dengan hasil positif adanya warna jingga pada lempeng KLT yang telah disemprot menggunakan Dragendorff.



Gambar 2. Isolat b1 pada detektor UV 254 nm (a), UV 366 nm (b), pe-nampak bercak Cerium(IV) Sulfat (c1), dan preaksi bercak Dragendorff (c2), dengan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak n-heksana : etil asetat 1:1 (v/v)

Karakterisasi isolat aktif (isolat b1) dilakukan melalui pendekatan menggunakan spektroskopi inframerah (IR), ultraviolet (UV) dan spektrum massa (MS), selain itu juga dilakukan pengukuran titik lebur.

1. Spektrum Ultraviolet (UV) : Pemeriksaan isolat b1 dalam kloroform pada spektroskopi UV menunjukkan adanya λ_{max} yaitu pada 241 nm dan 345 nm, artinya bahwa isolat b1 mempunyai ikatan rangkap terkonjugasi yang ditunjukkan adanya serapan pada λ 345 nm⁵.
2. Spektrum Infra Merah (IR) : Isolat b1 diperiksa dalam bentuk pelet KBr. Spektrum IR menunjukkan adanya puncak serapan karakteristik dari gugus-gugus pada -NH, CH, CH₂, CH₃, C=O α , β tidak jenuh, C-O dan C-C.
3. Spektrum Massa (MS) : Isolat b1 mempunyai titik lebur 182,4-183,0°C. Data spektrum MS memberikan informasi mengenai bobot molekul dari isolat b1 adalah m/z 351 dengan kehilangan fragmen 29 (m/z 351-322) yang memberi indikasi adanya gugus -CH₂CH₃. Kemudian puncak pada m/z 308 terjadi karena kehilangan 14 (-CH₂) dari puncak m/z 322, dan puncak pada m/z 280 terjadi karena kehilangan fragmen 28 yang kemungkinan CH=NH.

KESIMPULAN

1. Skrining terhadap 17 ekstrak aktif (100% pada konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$) tumbuhan asal Kalimantan Tengah dengan uji BST diperoleh hasil 10 ekstrak yang mempunyai toksisitas terhadap *A. salina* dengan prosentase kematian sebesar 100% pada konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$, salah satu ekstrak aktif tersebut adalah ekstrak CHCl_3 03 bfar 029 yang diidentifikasi sebagai *Fibraurea chloroleuca* Miers.
2. Hasil isolasi terhadap ekstrak CHCl_3 *F. chloroleuca* diperoleh 3 isolat yaitu : isolat a, b, dan c (66%, 88% dan 6%: 20 $\mu\text{g/ml}$ BST). Isolat b, terdiri dari 2 isolat : isolat b1 dan isolat b2.
3. Isolat b1 merupakan senyawa toksik hasil isolasi dari ekstrak CHCl_3 *F. chloroleuca* mempunyai harga LC_{50} sebesar 4,5 $\mu\text{g/ml}$ dengan metode BST dan prosentase penghambatan sebesar 20,08% pada konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$ dengan uji sitotoksik menggunakan sel HeLa.
4. Isolat b1 merupakan senyawa alkaloid dengan bentuk serbuk berwarna oranye dengan titik lebur 182,4-183,0°C mempunyai panjang gelombang 241 nm dan 345 nm. Data spektra MS dan IR menunjukkan isolat b1 mempunyai bobot molekul 351 mu yang mempunyai gugus-gugus -OH, C-O, CH_2 , CH_3 , -CH, -C=O (α , β tidak jenuh), -NH sekunder, dan inti aromatik.

Ucapan Terima Kasih

Penulis ucapkan terima kasih kepada rekan-rekan di Laboratorium Biologi Farmasi, UGM yang telah membantu jalannya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Aspan, R., 2004, Pengembangan Pemanfaatan Obat Bahan Alam dalam Pelayanan Kesehatan Masyarakat, *Makalah Seminar Tanaman Obat Indonesia*, Tawangmangu, Surakarta
2. Meyer N., Ferrigni A.R., Putuan J.E., Jacobsen L.B., Nicholas D.E., Mclaughin J.C., 1982, Brine Shrimp: A Convinient General Bioassay for Active Plant Constituent, *Planta Medica*, 982(45), 3-34
3. Anonim, 2004, *Identifikasi Potensi Hutan Sebagai Sumber Senyawa Bioaktif*, BKSDA-Fakultas Farmasi UGM, Jogjakarta
4. Harborne, J.B., 1987, *Metode Fitokimia*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Sudiro, Terbitan Kedua, Penerbit ITB, Bandung
5. Silverstein, R.M., Bassler, G.C., and Morrill, T.C., 1991, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, New York
6. Sitepu, D. dan Sutigno, P., 2001, Peranan Tanaman Obat Dalam Pengembangan HutanTanaman (*The Roles of Medicinal Plants on Plantation Forest Development*), *Buletin*, 2(2)
7. Duke, J.A dan Ayensu, E.S., 1985, *Medicinal Plants of China*, MI, Reference Publications, Inc., Algonac