

Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Alkaloid dari Tumbuhan *Alseodaphne peduncularis* (Wall. Ex. Ness) Meissn (Medang Hitam) serta Uji Sitotoksik terhadap Sel HeLa (Kanker Servik)

Ulil Amna¹, Halimatussakdiah¹

¹) Program Studi Kimia, Fakultas Teknik Universitas Samudra, Meurandeeh - Langsa

INFORMASI ARTIKEL

Riwayat Artikel:

Dikirim 07 November 2016

Direvisi dari 15 November 2016

Diterima 30 November 2016

Kata Kunci:

Alseodaphne peduncularis

Alkaloid

Sitotoksik

ABSTRAK

Alseodaphne peduncularis (Wall. Ex. Ness) dari suku Lauraceae merupakan salah satu tumbuhan yang diketahui memiliki senyawa alkaloid. Aktivitas biologis dari senyawa alkaloid sebagai antikanker telah diuji secara luas pada beberapa sel kanker seperti kanker darah, kanker payudara dan kanker servik. Alkaloid Laurotetanina telah berhasil diisolasi dari daun *Alseodaphne peduncularis* (Wall. Ex. Ness). Analisis fitokimia dilakukan dengan metoda kromatografi mencakup pemisahan senyawa dengan kromatografi kolom dan pemurnian menggunakan KLT preparatif. Karakterisasi senyawa alkaloid dilakukan dengan metoda spektrofotometri menggunakan LC-MS, UV-VIS, IR dan NMR (1D dan 2D). Uji sitotoksik dari senyawa alkaloid laurotetanine terhadap sel HeLa (kanker servik) memberikan hasil yang potensial sebagai antikanker dengan nilai CD_{50} 2 μ g/mL.

© 2016 Jurnal Ilmiah JURUTERA. Dikelola oleh Fakultas Teknik. Hak Cipta Dilindungi.

1. Pendahuluan

Tumbuhan telah digunakan sejak berabad-abad yang lalu sebagai obat tradisional untuk mengobati berbagai macam penyakit. Kemampuan tumbuhan untuk menghasilkan metabolit sekunder dengan sifat dan aktivitas biologi yang bervariasi menjadikan tumbuhan sebagai salah satu sumber bahan alam terpenting yang dapat dikembangkan sebagai bahan dasar pembuatan obat, termasuk obat antikanker. Berdasarkan tinjauan Jain et al. (2011), 60 % obat-obatan antikanker yang dipergunakan secara luas saat ini berasal dari bahan alam. Dari berbagai penelitian juga diketahui bahwa sebagian besar alkaloid yang telah diisolasi dari berbagai jenis tumbuhan sangat potensial untuk dikembangkan sebagai obat antikanker.

Alseodaphne peduncularis merupakan tumbuhan dari suku Lauraceae yang tumbuh di hutan tropis. Tumbuhan suku Lauraceae ini telah diketahui mengandung banyak senyawa alkaloid yang bervariasi. Berdasarkan tinjauan pustaka, terdapat lebih dari 500 senyawa alkaloid yang diisolasi dari tumbuhan menunjukkan aktivitas sitotoksik yang kuat terhadap berbagai jenis sel kanker (Sun et al., 2014).

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa alkaloid dari tumbuhan *Alseodaphne peduncularis* (Wall. Ex. Ness) Meissn. Senyawa yang telah didapatkan kemudian dilanjutkan dengan pengujian aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa (kanker servik) untuk melihat potensi senyawa tersebut sebagai agen antikanker.

2. Tinjauan Pustaka

Alseodaphne peduncularis merupakan tumbuhan tingkat tinggi yang dikelompokkan dalam suku Lauraceae. Tumbuhan ini memiliki nama lokal yang berbeda di beberapa tempat, di India disebut sebagai "Nelthare" (Charles et al., 2011), di Malaysia disebut sebagai "Medang" (Omar et al., 2013), dan di Indonesia disebut sebagai "Medang Hitam" (Kuswanda, 2010), namun di beberapa tempat di Indonesia, seperti Kalimantan, tumbuhan ini juga dikenal dengan nama "Gemor" (Cahyana & Rachmadi, 2011). Tumbuhan ini tumbuh subur di daerah hutan tropis bahkan tersebar di setiap belahan benua. Distribusi penyebarannya yang paling banyak terdapat di benua Asia, termasuk China, Cambodia, India, Laos, Malaysia, Indonesia, Myanmar, Sri Lanka, Philippines, Vietnam and Thailand (Xiwen et al., 2008).

* Penulis Utama. email:ulil.amna@gmail.com



Gambar 1 Tumbuhan *Aseodaphne peduncularis* (Wall. Ex. Ness) Meissn. (Medang Hitam)

A. peduncularis (Gambar 1) merupakan jenis tumbuhan semak atau pohon kecil dengan ketinggian 6-12 m. Dahannya berwarna keputihan. Daun batang memiliki panjang sekitar 0,51 cm. Bunganya berwarna kehijauan dengan kelopak berwarna merah membesar. Bentuk buah lonjong dengan warna ungu gelap dan. Buah bentuknya ellipsoid atau bulat dengan warna ungu gelap (Thakur et al., 2012).

Tumbuhan dari suku Lauraceae telah diketahui kaya akan kandungan senyawa alkaloid. Alkaloid merupakan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan dari tumbuhan. Metabolit sekunder pada tumbuhan umumnya tidak penting bagi proses pertumbuhan, perkembangan atau reproduksi melainkan dihasilkan sebagai bentuk adaptasi terhadap lingkungan dan bertindak sebagai mekanisme pertahanan untuk membantu dalam kelangsungan hidupnya. Biosintesis metabolit sekunder pada tumbuhan berasal dari proses fotosintesis, glikolisis dan siklus Krebs sebagai senyawa antara, pada akhirnya, hasil dalam pembentukan metabolit sekunder juga dikenal sebagai produk alami. Manusia memanfaatkan metabolit sekunder ini sebagai obat-obatan, wewangian, perasa, pewarna, racun, stimulan, halusinogen dan insektisida (Dias et al., 2012).

Alkaloid berasal dari kata "alkali" dan digunakan untuk menggambarkan setiap basa nitrogen yang terkandung didalamnya. Berdasarkan kesamaan struktur kimianya, Nautiyal (2013) dan Pfister et al. (2001) mengklasifikasikan alkaloid dalam 14 kelompok; Pirolidin, Piperidin, Piridin, Indolizidin, Quinolizidin, Pirolizidin, Indol, Imidazol, Quinolin, Isoquinolin, Purin, Quinazolin, Tropan, dan Phenethylamina. Alkaloid Jenis isoquinolin, termasuk didalamnya aporphina, proaporphina dan oksoaporphina merupakan jenis yang paling banyak ditemukan pada suku Lauraceae. Sebagian besar jenis alkaloid ini telah dilaporkan aktif sebagai senyawa antioyidan (Lau et al., 2012), antikanker (Gerhardt et al., 2013), antimikrobyal, antifungal (Zhang et al., 2012), antitumor dan sitotoksik (Stevigny et al., 2005). Sebagai senyawa aktif antikanker, jenis alkaloid sangat potensial untuk dikembangkan sebagai bahan alami obat anti kanker.

Bhanot (2011) mendefinisikan bahwa kanker merupakan penyakit kronis yang disebabkan oleh pertumbuhan sel-sel yang tidak normal di dalam jaringan tubuh sehingga sel-sel tersebut menghancurkan sel-sel normal. WHO (2011) mencatat bahwa

kanker telah menjadi penyakit mematikan nomor dua di dunia dan angka penderitanya meningkat setiap tahun. Panigoro (2014) menyebutkan bahwa setiap tahun di diagnosa ada sekitar 12 juta orang menderita penyakit kanker dan sekitar 7 juta dari jumlah tersebut tercatat meninggal. Jumlah ini diperkirakan akan terus meningkat dua kali lipat pada tahun 2030 mencapai 27 juta dan sekitar 17 juta penderita akan meninggal.

Peningkatan kasus kematian penyebab kanker mendorong para peneliti untuk melakukan penelitian yang berkelanjutan untuk menemukan obat-obatan antikanker yang potensial. Beberapa agen pencegahan kemoterapi menggunakan obat-obatan sintesis telah digunakan untuk mengobati kanker, tetapi selain harganya yang relatif mahal, obat-obatan tersebut dapat menyebabkan keracunan yang membatasi penggunaannya. Penelitian dalam mencari obat-obat antikanker terus dilakukan untuk mendapatkan hasil yang optimal, sampailah pada tahun 1950 para peneliti memfokuskan pencarian obat pada tumbuhan dengan ditemukannya agen antikanker pertama vinca alkaloid; vincristine dan vinblastine dari tumbuhan *Catharanthus roseus* yang sampai sekarang masih dipakai dalam bidang medis sebagai obat antikanker yang sangat potensial. (Prakash et al., 2013; Jain & Jain, 2011). Pengembangan obat antikanker dari bahan alam menyediakan banyak kelebihan, selain efek samping yang rendah, bahan alam juga relatif murah dan mudah untuk disediakan.

3. Metode Penelitian

Penelitian diawali dengan pengambilan sampel tumbuhan *A. peduncularis* di Mersing, Johor, Malaysia. Spesimen kemudian diidentifikasi di herbarium kimia fakultas sains, Universitas Malaya. Pada penelitian ini, sampel yang digunakan adalah bahagian daun tumbuhan *A. peduncularis*. Proses ekstraksi sampel dilakukan dengan metoda sokletasi. Daun yang sudah dikeringkan dan dihaluskan sebanyak 3,5 kg diekstraksi dengan n-heksana sampai jernih dan disaring untuk memisahkan ekstrak dengan residu. Residu yang telah kering kemudian dibasahkan dengan amoniak 28% selama 2 jam. Prosedur ini dilakukan untuk menarik senyawa alkaloid yang ada pada daun, sehingga memudahkan proses isolasi senyawa alkaloid. Residu ini kemudian diekstraksi kembali menggunakan diklorometana sampai jernih. Ekstrak yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* untuk memperoleh ekstrak kasar diklorometana. Ekstrak kasar (44 gram) inilah yang selanjutnya akan digunakan untuk proses isolasi, pemisahan dan pemurnian senyawa.

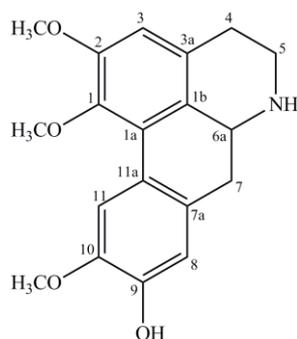
Proses isolasi senyawa alkaloid dilakukan menggunakan kromatografi kolom dengan variasi pelarut methanol: diklorometana dan n-heksana. Hasil pemisahan senyawa ini kemudian dilanjutkan dengan proses pemurnian dengan metoda KLT preparative menggunakan eluen methanol : diklorometana (1:9) sehingga diperoleh satu senyawa murni (*single spot*) sebanyak 100 mg. Untuk mengetahui struktur senyawa murni yang didapatkan, dilakukan analisis struktur menggunakan LC-MS, UV-VIS, IR dan NMR (1D dan 2D), juga membandingkan

hasil analisis dengan penelitian terdahulu untuk memastikan kebenaran penamaan senyawa.

Uji aktivitas sitotoksik dilakukan dengan metode MTT [3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium bromida]. Sel tumor HeLa diperoleh dari *American Type Cell Collection* (ATCC). Sel tumor HeLa dikultur dalam medium RPMI 1640 lengkap, Fetal Bovine Serum (FBS) 10%, dan penisilin-streptomisin 1%. Senyawa murni yang diperoleh dari proses sebelumnya, dibuat seri dosis 60; 30; 15; 7,5; 3,25 dan 1,625 $\mu\text{g/mL}$ dengan 3 kali pengulangan. Senyawa murni dimasukkan ke dalam microplate 96 sumuran sebanyak 100 μL . Sel lestari tumor HeLa dimasukkan ke dalam tiap sumuran masing-masing sebanyak 100 μL . Sediaan dalam *microplate* diinkubasikan selama 72 jam pada suhu 37° C dengan aliran CO₂ 5%. Setelah 72 jam ke dalam tiap-tiap sumuran ditambahkan MTT sebanyak 20 μL , diinkubasi kembali pada inkubator CO₂ selama 4 jam, kemudian semua supernatant dibuang dan ditambahkan 10 μL DMSO. Setelah beberapa menit, absorbansi dibaca menggunakan ELISA *reader* pada panjang gelombang 560 nm. Potensi penghambatan pertumbuhan sel untuk agen uji dinyatakan sebagai nilai CD50, yang menyatakan konsentrasi senyawa tertentu mampu mengurangi pertumbuhan sel sebanyak 50% pengurangan absorbansi rata-rata pada 560 nm.

4. Hasil Dan Pembahasan

Isolasi senyawa dari daun *A. peduncularis* diperoleh alkaloid dengan rumus molekul C₁₉H₂₁NO₄ sebagaimana yang teridentifikasi dari data HRESIMS (m/z 328.1540 [M+H]⁺). Alkaloid ini dikonfirmasi sebagai laurotetanina sebagaimana yang telah ditemukan oleh Hussain et al. (1980) pada tumbuhan *Machillus duthei*. Struktur laurotetanina ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur Alkaloid Laurotetanina

Analisis struktur senyawa ini dilakukan dengan mengombinasikan data spektrofotometri dari NMR, LC-MS, UV-VIS dan IR. Analisis NMR dilakukan untuk menentukan struktur senyawa yang mencakup analisis NMR 1D (¹H dan ¹³C) dan NMR 2D (COSY, HMQC, dan HMBC). Spektra ¹H menunjukkan adanya 9 proton yang terdistribusi pada range 2,8 sampai 7,8 ppm dengan rincian: 3 proton aromatik dengan puncak *singlet* pada δ 6,57 (H-3), 6,79 (H-8), dan 7,99 (H-11), 3 proton

metoksi pada δ 3,60, 3,87, dan 3,81 yang berikatan masing-masing dengan C-1, C-2, dan C-10 seperti ditunjukkan pada spektra HMQC, dan 3 proton alifatik muncul sebagai puncak *multiplet* pada range δ 2,80 and 3,50.

Tabel 1. Data Spektra NMR 1D (¹H [500 MHz, δ_{H} (J, Hz)] dan ¹³C [125 MHz, δ_{C}] dan 2D (HMBC, HMQC and COSY) dari Senyawa Alkaloid Laurotetanina dalam Pelarut CDCl₃

Position	¹ H δ_{H} (J, Hz), ppm	¹³ C δ_{C} , ppm	HMBC	HMQC	COSY
1		145.1			
1-OCH ₃	3.65 (s)	60.3	1	3H _{1-OCH3}	
1a		126.9			
1b		127.4			
2		152.3			
2-OCH ₃	3.88 (s)	55.9	2	3H _{2-OCH3}	
3	6.59 (s)	110.8	1, 1a, 2, 4	H ₃	
3a		128.8			
4	2.68 (d, 6.8) 3.05 (m)	28.8	3, 3a, 6a	H ₄	H ₅
5	3.03 (m) 3.40 (m)	43.0	3a, 6a	H ₅	H ₄
6a		53.7			
7	2.70 (m) 2.78 (dd, 5.15, 13.75)	36.3	6a, 7a, 8, 11a	H ₇	
7a		129.6			
8	6.78 (s)	114.1	7, 10, 11a	H ₈	
9		144.1			
9-OCH ₃	3.65 (s)	56.1	9	3H _{9-OCH3}	
10		145.5			
11	8.07 (s)	111.4	1a, 7a, 10, 11a	H ₁₁	
11a		123.9			

Spektra ¹³C menunjukkan adanya 19 karbon yang terdistribusi pada range 27,6 sampai 152,7 ppm dengan rincian: 3 karbon metoksi (1-OCH₃, 2-OCH₃ dan 10-OCH₃); 12 karbon aromatik (C-1, C-1a, C-1b, C-2, C-3, C-3a, C-7a, C-8, C-9, C-10, C-11 dan C-11a), satu CH (C-6a) and tiga CH₂ (C-4, C-5 and C-7). Analisis struktur senyawa juga didukung dengan data NMR 2D mencakup COSY yang menunjukkan korelasi antara satu proton dengan proton yang lain, HMQC yang menunjukkan hubungan langsung antara proton dan karbon dan HMBC yang menunjukkan korelasi antara proton dengan karbon yang terdistribusi dalam senyawa. Data NMR 1D dan 2D secara keseluruhan dapat dilihat pada Tabel 1.

Struktur yang diperoleh juga dikonfirmasi dengan data dari UV-VIS pada panjang gelombang 200-380 nm yang menunjukkan adanya serapan pada 230, 280 dan 300 sebagaimana skeleton dari *1,2,9,10-tetraoxygenated aporphine* (Sangster dan Stuart, 1965). Analisis IR digunakan untuk

mengkonfirmasi adanya gugus fungsi tertentu pada senyawa. Hasil analisis IR pada bilangan gelombang 400-4000 cm^{-1} menunjukkan adanya grup hidroksil terkonjugasi pada 3280 cm^{-1} dan serapan 1644 cm^{-1} menunjukkan adanya grup karbonil pada sistem aromatik (William dan Fleming, 1989).

Uji sitotoksik dilakukan terhadap sel HeLa (kanker servik) pada suhu 37°C selama 72 jam. Hasil pengujian menunjukkan CD_{50} sebesar 2 $\mu\text{g/mL}$ yang menjelaskan bahwa senyawa alkaloid laurotetanine memiliki aktivitas yang baik untuk menghambat sel kanker. Hal ini didasarkan pada evaluasi aktivitas sitotoksik oleh Omar et al. (2013), dimana dijelaskan bahwa senyawa yang memiliki CD_{50} kurang dari 5,0 $\mu\text{g/mL}$ merupakan senyawa yang sangat aktif, sedangkan senyawa yang memiliki CD_{50} antara 5,0 – 10 $\mu\text{g/mL}$ diklasifikasikan sebagai senyawa aktif dan CD_{50} diatas 10 $\mu\text{g/mL}$ tidak aktif sebagai sitotoksik.

5. KESIMPULAN

Proses isolasi, identifikasi dan karakterisasi menggunakan data spektrokopi senyawa yang diisolasi dari daun *Alseodaphne peduncularis* menghasilkan senyawa alkaloid laurotetanine. Hasil pengujian sitotoksik terhadap sel HeLa (kanker servik) menunjukkan bahwa senyawa ini memiliki aktivitas yang sangat baik untuk digunakan sebagai antikanker.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kami ucapkan kepada Universiti Pendidikan Sultan Idris, Grup Herbarium Universiti Malaya dan Laboratorium *Animal Tissue Culture* Universiti Sultan Zainal Abidin, Malaysia yang telah memfasilitasi pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Bhanot, A., Sharma, R. and Noolvi, M. N., Natural sources as potential anti-cancer agents: A review, *International Journal of Phytomedicine*, 2011; 3: 09-26.
- Cahyana, B. T. and Rachmadi, A. T., The Utilization of Gemor Bark (*Alseodaphne sp.*) and Hazelnut (*Aleurites molucca*) Shell as Natural Mosquitos Coil. *Jurnal Riset Industri Hasil Hutan*, 2011; 3(2): 13-18.
- Charles, A., Stanly, A. L., Joseph, M. and Ramani, V. A., GC-MS Analysis of bioactive components on the bark extract of *Alseodaphne semecarpifolia* Nees (Lauraceae). *Asian Journal of Plant Science and Research*, 2011; 1(4): 25-32.
- Dias, D. A, Urban, S. and Roessner, U., A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites.*, 2012; 2(2): 303-36. doi:10.3390/metabo2020303.
- Gerhardt, D., Bertola, G., Bernardi A., Pires, E. N. S., Frozza, R. L., Edelweiss, M. I. A., Battastini, A. M. O. and Salbego, C. G., Boldine Attenuates Cancer Cell Growth in an Experimental Model of Glioma *In vivo*. *J Cancer Sci Ther*, 2013; 5: 194-199.
- Hussain, S. F., Amin, A. and Shamma, M.. The Alkaloids of *Machillus duthei*. *J.chem.soc.pak.*, 1980; 2(4): 157-159.
- Jain, R and Jain, S. K., Screening of *in vitro* Cytotoxic Activity of Some Medicinal Plants Used Traditionally to Treat Cancer in Chhattisgarh State, India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2011; S147-S150.
- Kuswanda, W., Pengaruh Komposisi Tumbuhan terhadap Populasi Burung di Taman Nasional Batang Gadis, Sumatera Utara. *Jurnal Penelitian Hutan dan Konservasi Alam*, 2010; 7 (2): 193-213.
- Lau, Y. S., Machha, A., Achike, F. I., Murugan D. and Mustafa M. R., The aporphine alkaloid boldine improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Exp Biol Med*, 2012; 237: 93.
- Nautiyal, O. H., Natural Products from Plant, Microbial and Marine Species. *The Experiment International Journal of Science and Technology*, 2013; 10(1): 611-646.
- Omar, H., Hashim, N. M., Zajmi, A., Nordin, N., Abdelwahab, S. I., Azizan, A. H. S., Hadi, A. H. A., Ali, H. M., Aporphine alkaloids from the leaves of *Phoebe grandis* (Nees) Mer. (Lauraceae) and their cytotoxic and antibacterial activities. *Molecules*, 2013; 18(8): 8994-9009.
- Panigoro, S. S., Rencana Strategis Pengembangan Pusat Kanker Nasional Indonesia, Sebuah Studi Kasus, *Jurnal ARSI (Jurnal Administrasi Kebijakan Kesehatan)*, 2014; 1 (1) : 11-18.
- Pfister, J. A., Panter, K. I. P. E., Gardner, D. R., Stegelmeier, B. L., Ralphs, M. H., Molyneux, R. J. and Lee, S. T. Alkaloids as Anti-Quality Factors in Plants on Western U.S. Rangelands Do Alkaloids Alter Diet. *J. Range Manage*, 2001; 54: 447-461.
- Prakash, O., Kumar, A. & Kumar, P. and Ajeet, Anticancer Potential of Plants and Natural Products: A Review, *American Journal of Pharmacological Sciences*, 2013; 1 (6): 104-115.
- Sangster, A. W. and Stuart, K. L., Ultraviolet Spectra of Alkaloids. *Chem. Rev.*, 1965; 65.
- Stevigny, C., Bailly, C. and Leclercq, J. Q., Cytotoxic and Antitumor Potentialities of Aporphinoid Alkaloids. *Curr. Med. Chem.*, 2005; 5: 173-182.
- Sun, R., Jiang, H., Zhang, W., Yang, K., Wang, C., Fan, L., He, Q., Feng, J., Du, S., Deng, Z. and Geng, Z., Cytotoxicity of Aporphine, Protoberberine, and Protopine Alkaloids from *Dicranostigma leptopodum* (Maxim.) Fedde. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014; 1-7.
- Thakur, B. K., Anthwal, A., Singh, D., Rawat, B. and Rawat, M. S. M. A Review on Genus *Alseodaphne*: Phytochemistry

- and Pharmacology. *Mini Reviews in Organic Chemistry*, 2012; 9: 433-445.
19. William, D. H. and Fleming, I, *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*. Europe: Mc-Graw-Hill Book 1989; 4th eds: pp. 1-29.
20. Xiwen, L., Jie , L. and Werff, H. V. D., *Alseodaphne Ness. Flora of China*, 2008; 7: 227-230.
21. Zhang, W., Hu, J. F., Lv, W. W., Zhao, Q. C. and Shi, G. B., Antibacterial, Antifungal and Cytotoxic Isoquinoline Alkaloids from *Litsea cubeba*. *Molecules*, 2012; 17: 12950-12960.