

ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS SENYAWA AKTIF SITOTOKSIK DARI TUMBUHAN AKAR TAPAK KUDA (*Bauhinia hullettii* Prain)

Aci Nurchandari¹, Jimmi Copriady dan Lenny Anwar S.

Program Studi Pendidikan Kimia, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Riau

ABSTRACT

*This study aimed to isolate the active cytotoxic compound from akar tapak kuda (*Bauhinia hullettii* Prain) and tested its cytotoxic activity using BSLT method. Sample studied was leaves of akar tapak kuda. Phytochemical screening results showed that sample contains triterpenoid, steroid, flavonoid, phenolic and saponin compounds. As much as 1,4 kg of sample in the form of dry powder was extracted by maceration method using solvent n-hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol. Extraction resulted 28,6368 g of n-hexane fraction, 39,1009 g of dichloromethane fraction, 21,3175 g of ethyl acetate fraction and 113,9438 g of methanol fraction. Cytotoxic activity test has been conducted to dichloromethane, ethyl acetate and methanol fractions. The results of test showed that LC₅₀ values of n-hexane, dichloromethane and methanol fractions were 123,7758 ppm, 2.729,1905 ppm and 829,7525 ppm, respectively. It means that ethyl acetate fraction was not active cytotoxic, while dichloromethane and methanol fractions were active cytotoxic. Dichloromethane fraction was the most active fraction so that its separation needs to be continued.*

As much as 30 g of concentrated dichloromethane fraction was separated using chromatography technique, namely vacuum liquid chromatography and gravity column chromatography with various eluent systems. Separation resulted 231 mg white needle-shaped crystal as isolate that contained of two spot based on TLC analysis. Phytochemical test indicates that the isolate was triterpenoid and steroid compounds. The results of cytotoxic activity test showed that LC₅₀ value of the isolate was 605,1815 ppm. It means that isolate was active cytotoxic.

Key Words: Akar Tapak Kuda (*Bauhinia hullettii* Prain) Leaves, Cytotoxic Activity, BSLT

PENDAHULUAN

Tumbuhan menghasilkan metabolit sekunder yang berpotensi sebagai senyawa bioaktif dan sangat berguna bagi kehidupan manusia. Setiap tumbuhan menghasilkan satu atau lebih senyawa bioaktif dengan aktivitas tertentu. Senyawa bioaktif yang terkandung di dalam fraksi senyawa maupun senyawa murni dari suatu tumbuhan hampir selalu toksik pada dosis tinggi. Salah satu metode pendeteksian senyawa bioaktif yang sering digunakan adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Metode BSLT menggunakan kematian larva udang *Artemia salina* Leach sebagai bioindikator. Fraksi senyawa ataupun senyawa murni dikatakan berpotensi bioaktif (bersifat sitotoksik) jika memiliki nilai LC₅₀ kurang dari 1.000 ppm, di mana dalam rentang nilai LC₅₀ 0-1.000 ppm, semakin kecil nilai LC₅₀ suatu sampel, maka sifat sitotoksiknya semakin besar (Meyer, *et al.*, 1982). Keuntungan metode BSLT adalah pengerjaannya cepat, murah, sederhana, hanya memerlukan sedikit bahan yang mudah diperoleh dan dapat dilakukan secara berulang.

Bauhinia merupakan salah satu genus tumbuhan yang diketahui kaya akan senyawa bioaktif. Pettit, *et al.*, (2005) berhasil mengisolasi empat senyawa baru yang diberi nama bauhiniastatin 1-4 dari *Bauhinia purpurea* dan aktif sebagai antikanker. Aderogba, *et al.*, (2006) melaporkan dua senyawa golongan flavonoid dari fraksi etil asetat daun *Bauhinia monandra* Kurz dan memiliki aktivitas antioksidan yang sangat tinggi. Menezes, *et al.*,

¹aci.nurchandari@gmail.com

(2007) melaporkan adanya aktivitas hipoglikemik dari ekstrak akuades daun *Bauhinia forficata* L. dan *Bauhinia monandra* Kurz. Aktivitas antimikroba dilaporkan oleh Dhale (2011) dari ekstrak alkohol *Bauhinia variegata* Linn. Pepato (2002) juga melaporkan air rebusan daun *Bauhinia forficata* L. memiliki aktivitas antidiabetes. Sementara itu, Kumar, et al., (2011) melaporkan adanya aktivitas antelmintik (anticacing) dari ekstrak air dan etanol (95%) *Bauhinia purpurea* Linn.

Salah satu spesies lain dari tumbuhan genus *Bauhinia* adalah akar tapak kuda (*Bauhinia hullettii* Prain). Akar tapak kuda merupakan tumbuhan hutan tropis yang tumbuh menjalar dan merambat. Buahnya berupa polong-polongan dan bunganya berwarna ungu seperti anggrek. Daunnya menyerupai sayap kupu-kupu yang menandakan ciri khas dari tumbuhan genus *Bauhinia*. Tumbuhan akar tapak kuda umumnya terdapat di Semenanjung Malaya dan Pulau Sumatera (Herbarium ANDA, 2007).

Penelusuran literatur yang dilakukan menghasilkan bahwa belum banyak penelitian yang melaporkan kandungan kimia dan aktivitas farmakologis dari tumbuhan akar tapak kuda. Anwar, dkk., (2008) melaporkan ekstrak metanol dari kulit batang tumbuhan akar tapak kuda mempunyai aktivitas antioksidan sebesar 27,05%. Hasil uji aktivitas antioksidan dengan metode Feritiosianat (FTC) menunjukkan fraksi n-heksana, diklorometana dan etil asetat dari kulit batang tumbuhan akar tapak kuda mempunyai aktivitas antioksidan yang cukup kuat dibandingkan dengan senyawa antioksidan Butil Hidroksi Toluen (BHT). Penelitian lain melaporkan dari fraksi etil asetat kulit batang tumbuhan akar tapak kuda telah berhasil diisolasi senyawa flavonoid, yaitu 5,7-dihidroksi-4'-metoksi-6-metilflavanon. Uji aktivitas antikanker senyawa tersebut menggunakan sel murine leukimia P-388 menunjukkan adanya aktivitas yang sangat kuat dengan nilai IC_{50} sebesar 7,8 μ M (Anwar, dkk., 2010).

Berdasarkan fakta yang telah diuraikan, tumbuhan akar tapak kuda telah terbukti mengandung senyawa bioaktif dan masih banyak yang belum dilaporkan, khususnya pada bagian daun. Secara filogenetik, (kecuali kelompok alga), tumbuhan hijau dalam satu famili atau genus biasanya memiliki kandungan senyawa dan aktivitas yang sama (Markham, 1988). Atas dasar inilah perlu dilakukan isolasi senyawa aktif sitotoksik dari daun tumbuhan akar tapak kuda dan pengujian aktivitas sitotoksiknya menggunakan metode BSLT. Dengan mengisolasi dan mempelajari kandungan metabolit sekunder serta aktivitas sitotoksiknya, diharapkan adanya peningkatan nilai terhadap manfaat dan daya guna dalam rangka pelestarian tumbuhan hutan tropis Indonesia, khususnya di Pulau Sumatera.

METODE PENELITIAN

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tumbuhan akar tapak kuda yang berasal dari hutan lindung PT. Bukit Barisan, Sumatera Selatan. Sampel dibersihkan dan dikeringanginkan pada temperatur kamar, kemudian digiling halus sehingga menghasilkan 1,4 kg serbuk daun. Serbuk daun kering diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut yang ditingkatkan kepolarannya, secara berturut-turut yaitu n-heksana, diklorometana, etil asetat dan metanol. Ekstraksi dilakukan sebanyak 4 kali untuk masing-masing pelarut, filtrat yang dipisahkan dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator*. Fraksi diklorometana, etil asetat dan metanol diuji aktivitas sitotoksiknya menggunakan metode BSLT. Fraksi aktif sitotoksik dilanjutkan pemisahannya dengan kromatografi kolom menggunakan sistem pelarut yang kepolarannya ditingkatkan secara bertahap (*step gradient polarity*). Setiap pemisahan diawali dengan preadsorpsi sampel menggunakan silika gel 60 dengan perbandingan 1:1 terhadap sampel. Fraksi-fraksi yang dihasilkan dari setiap pemisahan dipantau dengan plat KLT silika gel GF₂₅₄ menggunakan pelarut yang sesuai. Setelah elusidasi selesai, plat disemprot dengan pereaksi penampak noda serum sulfat 1,5% dalam asam sulfat 2 N. Isolat yang menunjukkan pola noda yang baik dan berpotensi menghasilkan kristal diuji aktivitas sitotoksiknya menggunakan metode BSLT.

Pengujian aktivitas sitotoksik berdasarkan metode BSLT dilakukan sesuai dengan cara berikut. Telur udang *Artemia salina* Leach ditetaskan dalam air laut dengan menggunakan wadah kaca berukuran 25 cm x 15 cm x 11 cm. Pada bagian tengah wadah diberi sekat bercelah di bagian bawahnya sehingga wadah terbagi menjadi dua bagian, yaitu bagian terang (disinari dengan lampu pijar 60 Watt) dan bagian gelap. Telur diletakkan di bagian gelap selama 48 jam agar menetas. Pada bagian terang diberi aerasi sebagai penyedia oksigen. Larva dari telur udang yang baru menetas akan bergerak menuju bagian terang dan siap digunakan untuk uji aktivitas sitotoksik. Sebanyak 20 mg sampel dilarutkan dengan 2 mL metanol sehingga menghasilkan larutan induk 10.000 µg/mL. Larutan induk dipipet menggunakan pipet mikro sebanyak 5, 50 dan 500 µg/mL (triplo) dan dimasukkan ke masing-masing vial, sehingga secara berturut-turut menghasilkan larutan uji dengan konsentrasi 10, 100 dan 1.000 µg/mL. Pelarut dibiarkan menguap. Sampel dilarutkan kembali dengan 50 µg/mL larutan dimetilsulfoksida, kemudian ditambahkan dengan 2 mL air laut. Larva udang dimasukkan sebanyak 10 ekor ke tiap-tiap vial dan ditambahkan lagi dengan air laut hingga volum 5 mL. Pengujian dilakukan selama 24 jam, kemudian dihitung jumlah rata-rata larva udang yang mati. Berdasarkan data yang diperoleh, nilai LC₅₀ dapat dianalisis dengan menggunakan metode analisis Probit (Meyer, *et al.*, 1982).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi menghasilkan 28,6368 g fraksi n-heksana, 39,1009 g fraksi diklorometana, 21,3175 g fraksi etil asetat dan 113,9438 g fraksi metanol. Uji aktivitas sitotoksik yang dilakukan terhadap fraksi diklorometana, etil asetat dan metanol memberikan nilai LC₅₀ secara berturut-turut 123,7758 ppm, 2.729,1905 ppm dan 829,7525 ppm. Menurut Meyer, *et al.*, (1982), fraksi senyawa ataupun senyawa murni dikatakan berpotensi aktif sitotoksik jika memiliki nilai LC₅₀ kurang dari 1.000 ppm. Berdasarkan data yang diperoleh diketahui bahwa fraksi diklorometana dan metanol bersifat aktif sitotoksik, namun fraksi diklorometana lebih aktif dibandingkan fraksi metanol.

Pemisahan dilanjutkan terhadap fraksi diklorometana dengan teknik Kromatografi Vakum Cair (KVC) dan Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG) menggunakan pelarut yang ditingkatkan kepolarannya secara bertahap. Pemisahan dengan KVC dilakukan secara dua tahap dan menghasilkan enam fraksi gabungan, yaitu fraksi A (439,6 mg), fraksi B (4.730,5 mg), fraksi C (5.891,3 mg), fraksi D (2.410,2 mg), fraksi E (1.230,7 mg) dan fraksi F (1.275,8 mg). Fraksi A, B, C, E dan F berpotensi menghasilkan kristal, terbukti dari adanya kristal yang menempel di dinding vial setelah semua pelarut menguap, sedangkan fraksi D tidak. Dari kelima fraksi yang berpotensi menghasilkan kristal, fraksi C memberikan pola pemisahan yang baik berdasarkan hasil uji KLT, maka pemisahan dilanjutkan terhadap fraksi C menggunakan teknik pemisahan KKG.

Pemisahan fraksi C dilakukan sebanyak dua tahap menggunakan teknik pemisahan KKG_I dan KKG_{II}. Pemisahan ini menghasilkan sepuluh fraksi gabungan, yaitu fraksi G (8,6 mg), fraksi H (30,7 mg), fraksi I (1.084,7 mg), fraksi J (825,5 mg), fraksi K (754,2 mg), fraksi L (675,4 mg), fraksi M (427,8), fraksi N (2.474,2 mg), fraksi O (43,9 mg) dan fraksi P (341,2 mg). Beberapa vial menunjukkan adanya kristal dengan berbagai bentuk. Kristal berwarna cokelat muda kekuningan dan berbentuk jarum terdapat pada vial fraksi J. Kristal ini sangat dominan dibandingkan dengan kristal-kristal lainnya. Hasil uji KLT juga menunjukkan bahwa fraksi J menghasilkan pola pemisahan yang baik. Oleh karena itu, pemisahan lebih lanjut dilakukan terhadap fraksi J.

Pemisahan fraksi J juga dilakukan dengan menggunakan teknik pemisahan KKG_{III} dan menghasilkan tujuh fraksi gabungan, yaitu fraksi J₁ (63,9 mg), fraksi J₂ (31 mg), fraksi J₃ (231 mg), fraksi J₄ (61,5 mg), fraksi J₅ (140,3 mg), fraksi J₆ (3,4 mg) dan fraksi J₇ (1,3 mg). Pada fraksi J₃ terdapat kristal berbentuk jarum dan berwarna putih. Berdasarkan uji KLT,

senyawa-senyawa pada fraksi J₃ memberikan pola noda yang baik. Noda yang dihasilkan berbentuk lonjong dan terdiri dari dua warna dengan penampakan noda serum sulfat 1,5% dalam asam sulfat 2 N, yaitu merah dan biru. Warna merah mengindikasikan senyawa triterpenoid dan warna biru mengindikasikan senyawa steroid. Noda-noda yang muncul dari fraksi J₃ memiliki nilai R_f yang berdekatan. Saat penampakan noda dilakukan, noda berwarna biru muncul lebih dulu dan beberapa saat kemudian muncul noda berwarna merah pada spot yang sama. Pencarian pelarut yang cocok untuk pemisahan selanjutnya dilakukan dengan uji KLT menggunakan variasi pelarut n-heksana, diklorometana dan etil asetat dengan perbandingan 6:3:1, 3:6:1 dan 3:5:2, namun kedua noda tetap tidak memisah. Akhirnya pemisahan terhadap fraksi J₃ tidak dilanjutkan. Hasil ini juga mempertegas bahwa fraksi J₃ belum murni berdasarkan analisis KLT.

Uji aktivitas sitotoksik dilakukan terhadap fraksi J₃ dengan menggunakan metode BSLT dan memberikan nilai LC₅₀ sebesar 605,1815 ppm. Menurut Meyer, *et al.*, (1982), fraksi senyawa maupun senyawa murni yang memiliki nilai LC₅₀ kurang dari 1.000 ppm bersifat aktif sitotoksik. Karena nilai LC₅₀ dari fraksi J₃ memenuhi syarat tersebut, maka fraksi J₃ dikatakan bersifat aktif sitotoksik. Artinya di dalam fraksi J₃ terdapat senyawa yang bersifat aktif sitotoksik.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan penelitian yang dilakukan terhadap daun tumbuhan akar tapak kuda, telah berhasil diisolasi isolat berupa kristal jarum berwarna putih sebanyak 231 mg dari fraksi diklorometana. Analisis kemurnian isolat dengan uji KLT menggunakan variasi pelarut n-heksana, diklorometana dan etil asetat dengan perbandingan 6:3:1, 3:6:1 dan 3:5:2 menunjukkan isolat terdiri dari dua noda yang berwarna merah dan biru sehingga dapat disimpulkan bahwa isolat belum murni. Hasil uji aktivitas sitotoksik yang dilakukan terhadap isolat menggunakan metode BSLT memberikan nilai LC₅₀ sebesar 605,1815 ppm. Berdasarkan data tersebut dapat disimpulkan bahwa isolat bersifat aktif sitotoksik. Namun, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk memisahkan senyawa-senyawa yang terdapat di dalam isolat menggunakan teknik kromatografi lain dan menguji aktivitas sitotoksik dari masing-masing senyawa tersebut menggunakan metode BSLT, sehingga selanjutnya dapat dilakukan penentuan struktur dari senyawa yang aktif sitotoksik berdasarkan kajian spektroskopi.

DAFTAR PUSTAKA

- Aderogba, M. A., A. O. Ogundaini and J. N. Eloff, 2006, Isolation of Two Flavonoids From *Bauhinia monandra* (Kurz) Leaves and Their Antioxidative Effects, *Afr. J. Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 3(4): 59-65.
- Anwar, L., Eliza dan Julinar, 2008, Eksplorasi Kandungan Kimia Antioksidan Tumbuhan *Bauhinia hullettii* Prain dari Kawasan Hutan Lindung PT. BA Tanjung Enim Sumatera Selatan, Laporan Penelitian Dosen Muda, Universitas Sriwijaya.
- Anwar, L., Julinar dan Fitrya, 2010, Senyawa Flavanon dari Kulit Batang *Bauhinia hullettii* Prain dan Uji In Vitro Sel Kanker Murine P388, Makalah disampaikan pada Seminar dan Rapat Tahunan BKS PTN MIPA Wilayah Barat ke-23, Pekanbaru, 10-11 Mei 2010.
- Dhale, D. A., 2011, Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of *Bauhinia variegata* Linn, *Journal of Ecobiotechnology*, 3(9): 04-07.
- Herbarium Universitas Andalas (ANDA), 2007, *Hasil Identifikasi*, Padang, Sumatera Barat.
- Kumar, T., Amit A., Dhansay D. and Kushagra N., 2011, Anthelmintic Activity of The Whole Plant of *Bauhinia purpurea* (Linn.), *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, Vol. 4, Suppl 1.

- Markham, K. R., 1988, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, Terjemahan: Kosasih Padmawinata, ITB, Bandung.
- Menezes, F. S., Andréa B. M. M., Halliny S. R., Ricardo M. K., Helen S. and Neil F., 2007, Hypoglycemic Activity of Two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz, Brazilian Journal of Pharmacognosy, 17(1): 08-13.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E. and McLaughlin, J. L., 1982, Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *J. of Medical Plant Medica*, 45: 31-34.
- Pepato, M. T., E. H. Keller, A. M. Baviera, C. Kettelhut, R. C. Vendramini and I. L. Brunetti, 2002, Anti-diabetic Activity of *Bauhinia forficata* Decoction In Streptozotocin-diabetic Rats, Journal of Ethnopharmacology, Vol 81, Issue 2, Pages 191-197.
- Pettit, G. R., Atsushi N., Chika I., Yoshihide U., Takeshi Y., Hirofumi O. and Gordon M. C., 2005, Antineoplastic Agents .551. Isolation and Structures of Bauhiniastatins 1-4 from *Bauhinia purpurea*, J. Nat. Product, 69(3): 323-327.