Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi, Vol. 7, No. 1, 2002, 13 - 18
Akreditasi Dikti Depdiknas RI No. 69/DIKTI/Kep/2000

ISSN : 1410-0177

Isolasi Komponen Utama Fraksi Aktif "Brine Shrimp Test"dari Daun *Anthocephalus Cadamba* Miq.

Fauzia Rozani*, M. Husni Mukhtar, Amri Bakhtiar, dan Dayar Arbain
Jurusan Farmasi FMIPA, Universitas Andalas, Padang

Diterima 1 Februari 2002 : Disetujui 1 Maret 2002

Abstract

In continuation of our work on the chemistry of biologically active constituents of Sumatran plants it was found that the basic ethyl acetate fraction of the methanolic extract of the leaves of *Anthocephalus cadamba* Miq. showed significant activity with LC_{50} 273,90 µg/ml when tested by "Brine Shrimp Lethality Assay". This active fraction was then column chromatographed with step gradient polarity elution by using an increasing amount of ethyl acetate in hexane. Fractions having the same R_f values were combined, evaporated and tested for its activity. The active fraction was then rechromatographed, retested, purified and identified. From the active fraction was isolated one pentacyclic triterpenoid compound and an isomer of indole alkaloid compound. The triterpenoid compound was isolated as needles with a melting point of 268-269°C and based on its spectroscopic data it was identified as ursolic acid and showed LC_{50} 26,24 µg/ml. toward "Brine Shrimp Test". The isomer of indole alkaloid compound was identified as valesiachotamine and isovalesiachotamine with LC_{50} > 1000 µg/ml.

Keywords : Brine shrimp test, leaves of *Anthocephalus cadamba* Miq., LC_{50}

Pendahuluan

Penyakit kanker merupakan salah satu ancaman utama terhadap kesehatan masyarakat dan penyebab kematian kedua setelah penyakit jantung. Masyarakat Indonesia telah mengenal bermacam ramuan yang secara tradisional digunakan sebagai obat kanker, seperti daun dewa (*Gynura procumbens*) untuk penyakit kanker kandungan, kanker payudara dan kanker darah (Meiyanto dan Sugiyanto, 1997).

Obat-obat antikanker erat kaitannya dengan senyawa yang bersifat sitotoksik. Salah satu metoda yang digunakan untuk pengujian awal terhadap senyawa atau bahan yang bersifat sitotoksik ini adalah uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach ("Brine Shrimp Lethality Bioassay"), dimana uji ini dapat digunakan untuk skrining awal senyawa yang diduga berkhasiat antikanker, karena mempunyai korelasi positif dengan potensinya sebagai antikanker (Meyer *et al.* , 1982).

Dari hasil survey fitokimia di Hutan Lubuk Minturun Kotamadya Padang Sumatera Barat, didapatkan tumbuhan dengan toksisitas yang kuat terhadap anak udang yaitu *Anthocephalus cadamba* Miq. dari famili Rubiaceae. Tumbuhan ini berupa pohon dengan tinggi belasan meter, hidup tersebar di daratan Asia Tenggara sampai ke Asia Barat (India), di Indonesia dari Sumatera sampai ke Irian Jaya. Di India digunakan sebagai obat demam dan tonik (Burkill, 1966). Masyarakat disekitar Cagar Alam Cyclops, Irian Jaya mengggunakan untuk mengobati penyakit kuning (Agusta, 1997).

Melihat aktifitas ekstrak tumbuhan ini terhadap uji toksisitas terhadap larva udang (Brine Shrimp Test"), diperkirakan tumbuhan ini mengandung senyawa yang bersifat sitotoksik. Untuk itu dicoba mengisolasi komponen utama fraksi aktif dari daun *Anthocephalus cadamba* Miq. serta kemungkinan pengembangan dalam bidang pengobatan kanker.

*Penulis untuk korespondensi : Tel. 62-751-71682, Faks: 62-751-73118
E-mail : farmasi_unand@telkom.net

Metode Penelitian

Bahan dan alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah metanol, etanol, heksan, etil asetat, butanol, kloroform, air suling, amonia, asam asetat glasial, anhidrida asetat, asam sulfat, asam klorida, natrium subkarbonat, natrium sulfat, besi(III)klorida, logam magnesium, iodum, pereaksi Mayer, pereaksi Liebermann-Burchard, silika gel (230-400 mesh), sephadex LH-20, plat KLT silika gel 60 GF_{254} (Merck), dan dimetil sulfoksida dengan kualitas pro-analisis serta air laut dan kista *Artemia salina* Leach.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bejana maserasi, penangas air "rice cooker", perangkat destilasi biasa dan vakum, perangkat rotary evaporator, kolom kromatografi, bejana kromatografi, alat-alat gelas, lampu ultraviolet dengan λ 254 nm (Camag), spektrofotometer inframerah (BIORAD/ DIGILAB FTS-45), spektrofotometer ultraviolet (Secoman 2000), spektrometer resonansi magnit inti (Bruker WP 300) untuk ^{1}H, ^{13}C RMI, alat pengukur titik leleh (Fisher Johns Melting Point Apparatus), polarimeter (Perkin Elmer 141), wadah pembiakan larva udang laut *Artemia salina* Leach.

Pengambilan dan identifikasi sampel

Sampel yang digunakan adalah daun tumbuhan *Anthocephalus cadamba* Miq., yang diambil di Hutan Lubuk Minturun Kotamadya Padang pada bulan Juli 1998. Identifikasi tumbuhan dilakukan di Herbarium Universitas Andalas (ANDA) dan spesimen herbarium ini disimpan ditempat tersebut dengan nomor koleksi DA-RT 7993.

Ekstraksi dan fraksinasi

Daun segar *Anthocephalus cadamba* Miq. sebanyak 8 kg dirajang halus, dimaserasi dengan metanol. Ekstrak metanol diuapkan secara *in vacuo* sampai diperoleh ekstrak kental ± 1,5 l. Ekstrak kental metanol ini diuji aktivitas sitotoksiknya dengan metoda " Brine Shrimp Test" (Meyer *et al.*, 1982). Ekstrak kental metanol ini difraksinasi berturut-turut dengan heksan, heksan , etil asetat , etil asetat basa dan butanol. Fraksi yang didapat ini diuapkan dan diperoleh fraksi heksan (87,20 g), etil asetat (53,42 g), etil asetat basa (55,15 g) dan butanol (247,21 g). Masing-masing fraksi diuji toksisitasnya terhadap larva udang dengan metoda "Brine Shrimp Test".

Pemisahan komponen utama fraksi aktif "Brine Shrimp Test"

Fraksi etil asetat basa (30 g) yang paling tinggi toksisitasnya dengan LC_{50} 273,90 µg/ml, dikromatografi kolom dengan fasa diam silika gel 60 (230-400 mesh) (150 g), diperoleh 7 fraksi yaitu fraksi A, B, C, D, E, F dan fraksi G. Masing-masing fraksi ini diuji toksisitasnya dengan metoda "Brine Shrimp Test".

Pada fraksi A terbentuk endapan, didekantasi (endapan A). Endapan A dimurnikan dengan cara rekristalisasi dengan metanol hingga diperoleh senyawa murni A_1 sebanyak 44 mg berupa kristal jarum halus berwarna putih, yang dengan pereaksi Liebermann-Burchard memberikan warna ungu. Terhadap senyawa A_1 ini, dilakukan uji toksisitasnya dengan metoda "Brine Shrimp Test".

Fraksi terlarut A yang paling tinggi toksisitasnya dengan LC_{50}220,50 µg/ml, sebanyak 5,50 g dikromatografi kolom dengan fasa diam silika gel 60 (230-400 mesh) (60 g), diperoleh 3 fraksi yaitu fraksi A_x, A_y dan A_z. Fraksi A_x membentuk endapan, didekantasi, kemudian dimurnikan dengan cara rekristalisasi dengan metanol dan etil asetat, diperoleh senyawa A_2 berbentuk kristal plat berwarna kuning muda sebanyak 58 mg yang positif dengan pereaksi Dragendorff dan Mayer. Terhadap senyawa A_2 ini, dilakukan uji toksisitasnya dengan metoda "Brine Shrimp Test".

Uji toksisitas terhadap larva udang dengan metoda "Brine Shrimp Test" terhadap ekstrak metanol, hasil fraksinasi dan senyawa hasil isolasi

Telur *Artemia salina* Leach dimasukkan ke dalam wadah berisi air laut, dalam 24 jam akan menetas membentuk larva, dan baru digunakan setelah 48 jam. Bahan uji yang digunakan sebanyak 20 mg dibuat larutan uji dengan konsentrasi 1000, 100 dan 10 µg/ml. Jumlah larva udang yang digunakan untuk setiap pengamatan 10 ekor. Kematian larva udang dianati setelah 24 jam. Dari data yang dihasilkan dapat dihitung nilai LC_{50} nya dengan analisis probit

Karakterisasi senyawa hasil isolasi

Karakterisasi senyawa hasil isolasi meliputi pemeriksaan titik leleh, pemeriksaan spektrum UV, pemeriksaan spektrum IR , pemeriksaan spektrum Resonansi Magnetik Inti (RMI) meliputi spektrum ^{1}H RMI dan ^{13}C RMI, spektrum dua dimensinya (HMQC dan HMBC) serta pemeriksaan rotasi optik.

Hasil dan Pembahasan

Dengan toksisitas LC_{50} 281,50 µg/ml ekstrak metanol tumbuhan *Anthocephalus cadamba* Miq. terhadap larva udang laut *Artemia salina* menunjukkan tumbuhan ini mengandung senyawa aktif yang dapat diisolasi dan diteliti lebih lanjut karena secara umum ekstrak tumbuhan yang mempunyai LC_{50} < 1000 µg/ml termasuk aktif biologis (Meyer *et al.*, 1982).

Dari pengerjaan fraksinasi yang dimonitor bioaktifitasnya dengan uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina*, ternyata fraksi etil asetat basa yang paling aktif dengan nilai LC_{50} 273,90 µg/ml. Fraksi ini dikromatografi kolom dan diikuti dengan pemurnian secara rekristalisasi, berhasil diisolasi senyawa A_1 berbentuk kristal jarum halus berwarna putih, dengan jarak leleh 268-269° C yang memberikan warna ungu terhadap pereaksi Liebermann – Burchard, dengan nilai LC_{50} > 26,24 µg/ml dan senyawa A_2 berbentuk kristal plat kuning muda dengan jarak leleh 245-247 ^{0} C yang memberikan reaksi positif terhadap pereaksi Dragendorff dan Mayer dengan nilai LC_{50} > 1000 µg/ml.

Dari pemeriksaan spektrum ultraviolet senyawa A_1 didapat serapan maksimum pada panjang gelombang 206,4nm sedangkan spektrum inframerah dari senyawa ini menunjukkan adanya serapan pada bilangan gelombang 3433, 2928, 1691, 1459, 1387 dan 991 cm^{-1} .

Spektrum ^{1}H-RMI senyawa A_1 memperlihatkan beberapa kelompok proton pada pergeseran kimia (ppm) tertentu. Pada pergeseran kimia 5,48 ppm (1 H, t, $J_{12\text{-}11\alpha}$ 3,5, $J_{12\text{-}11\beta}$ 3,5 Hz, H-12), 3,45 ppm (1H, tt, $J_{3\text{-}2\alpha}$ 16,1 Hz , $J_{3\text{-}2\beta}$ 6,4, $J_{3\text{-}2\alpha}$ 6,4 Hz, H-3), 2,63 ppm (1 H, d, $J_{18\text{-}19}$ 11,2 Hz, H-18), 2,32 ppm (1 H, ddd, $J_{15\beta\text{-}15\alpha}$ 4,8 Hz; $J_{15\beta\text{-}16\alpha}$ 14,0 Hz dan $J_{15\beta\text{-}16\beta}$13,0 Hz, H-15), 2,11 ppm (1 H, ddd, $J_{16\alpha\text{-}15\alpha}$ 13,1 dan $J_{16\alpha\text{-}15\beta}$ 13,4 Hz, H-16) dan 1,62 ppm (1 H, dd, $J_{9\text{-}11\alpha}$ 7,8 dan $J_{9\text{-}11\beta}$ 9,9 Hz, H-9).

Spektrum ^{1}H RMI senyawa A_1 juga memperlihatkan adanya sinyal-sinyal proton-proton yang diperkirakan berasal dari beberapa gugus metil, hal ini didukung oleh data ^{13}C RMI, HMQC serta HMBC dari senyawa A_1. Sinyal-sinyal ini muncul pada pergeseran kimia (ppm) 1,24 (H-23); 1,01 (H-24); 0,87 (H-25); 1,04 (H-26); 1,22 (H-27); 0,99 (H-29) dan 0,94 (H-30).

Spektrum ^{13}C RMI dari senyawa A_1 memperlihatkan adanya 30 atom karbon. Dengan adanya spektrum DEPT 135 dan DEPT 90 dapat diketahui senyawa hasil isolasi memiliki 7 karbon primer, 9 karbon sekunder, 7 karbon tersier dan 7 karbon kuarterner. Satu dari karbon kuarterner tersebut berasal dari gugus karboksil yang muncul pada pergeseran kimia 179,9 ppm (C-28).

Substitusi yang terikat pada atom karbon tesier 78,1 ppm (C-3), diperkirakan adalah gugus hidroksil. Hal ini diperkuat oleh adanya serapan pada angka gelombang 3433 cm^{-1} pada spektrum inframerah dan atom karbon yang muncul pada 78,1 ppm (C-3) biasanya diberikan oleh atom karbon yang tersubstitusi oleh gugus hidroksi

Dengan membandingkan data-data diatas dengan spektrum-spektrum senyawa triterpenoid yang telah dilaporkan dalam literature terutama spektrum ^{13}C RMI (Tabel 1), senyawa A_1 ini disimpulkan sebagai asam ursolat (Kriwacki, 1989).

Uji toksisitas terhadap larva udang dengan metoda "Brine Shrimp Test" terhadap senyawa murni A_1 diperoleh nilai LC_{50} = 26,24 µg/ml, ini berarti senyawa A_1 mempunyai aktivitas toksisitas yang sangat kuat yang diperkirakan juga akan memiliki *aktifitas sitotoksik* yang kuat disamping juga akan aktif secara farmakologis.

Spektrum ^{13}C RMI senyawa A_2, memperlihatkan adanya 41 sinyal karbon yang muncul pada pergeseran kimia berbeda. Spektrum DEPT ^{13}C RMI (DEPT 135 dan 90), menunjukkan adanya 6 karbon sekunder, 15 karbon tersier dan 16 karbon kuartener serta 4 karbon primer.

Data spektrum ^{13}C RMI dari senyawa A_2 dibandingkan dengan alkaloid yang sebelumnya telah diisolasi dari *Ophiorrhiza sp* (Arbain, *et al.*, 1998), seperti tercantum pada (Tabel 2), dapat disimpulkan senyawa A_2 merupakan campuran valesiakotamin dan isovalesiakotamin dengan perbadingan lebih kurang 11:10.

Tabel 1. Perbandingan data spektrum ^{1}H dan ^{13}C RMI senyawa A_1 dan asam ursolat

^{1}H	Senyawa (A_1)	Asam ursolat (Kriwacki, 1989)	Asam ursolat (Xiang)	^{13}C	Senyawa (A_1)	Asam ursolat (Kriwacki, 1989)	Asam ursolat (Xiang)
·	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)		δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
1α		0,95		1	39,1	39,1	39,1
1β		1,52		2	28,1	28,1	28,1
2α		1,82		3	78,1	78,1	78,1
2β		1,82		4	39,5	39,5	39,4
3	3,45	3,46	3,46	5	55,8	55,8	55,9
5		0,88		6	18,8	18,8	18,8
6α		1,56		7	33,6	33,6	37,4
6β		1,33		8	40,0	40,0	39,9
7α		1,55		9	48,1	48,1	48,0
7β		1,35		10	37,3	37,3	37,3
9	1,62	1,62		11	23,6	23,6	23,6
11α		1,94		12	125,7	125,7	125,6
11β		1,94		13	139,3	139,3	139,2
12	5,48	5,50	5,49	14	42,5	42,5	42,5
15α		1,20		15	28,7	28,7	28,7
15β	2,32	2,33		16	24,9	24,9	24,9
16α	2,11	2,12		17	48,1	48,1	48,0
16β		1,97		18	53,6	53,6	53,5
18	2,63	2,62	2,64	19	39,5	39,5	39,5
19		1,45		20	39,4	39,4	39,5
20		0,93		21	31,1	31,1	31,1
21α		1,40		22	37,5	37,5	33,6
21β		1,40		23	28,8	28,8	28,8
22α		1,95		24	16,6	16,5	16,6
22β		1,95		25	15,7	15,7	15,7
23	1,24	1,23	1,25	26	17,4	17,5	17,4
24	1,01	1,01	1,02	27	23,9	23,9	23,98
25	0,87	0,87	0,90	28	179,9	179,8	179,8
26	1,04	1,04	1,05	29	17,5	17,5	17,5
27	1,22	1,21	1,24	30	21,4	21,4	21,4
29	0,99	0,98	1,00				
30	0,94	0,93	0,96				

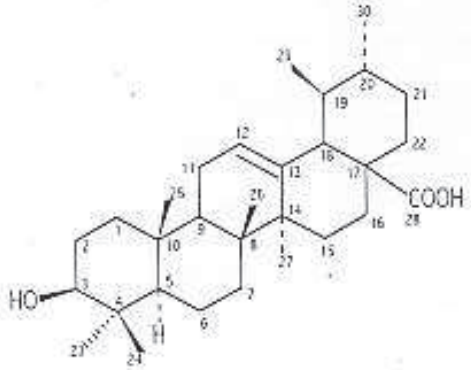
Tabel 2. Perbandingan data spektrum ^{13}C RMI senyawa A_2 dengan valesiakotamin dan isovalesiakotamin (Arbain, 1998).

No. Karbon	Senyawa A_2 δ (ppm)	Valesiakotamin δ (ppm)	Isovalesiakotami δ (ppm)
2	132,46 132,14	132,44	132,06
3	49,30 47,68	49,29	47,66
5	51,06 50,88	51,06	50,86
6	22,01 21,92	22,02	21,93
7	108,26 108,36	108,39	108,57
8	126,72 126,67	126,78	126,71
9	118,04 117,94	118,11	118,02
10	119,59 119,64	119,73	119,78
11	121,97 121,97	122,06	122.06
12	111,06 111,06	111,01	110,97
13	136,28 136,28	136,25	136,25
14	34,03 32,70	35,08	32,75
15	28,39 30,82	28,37	30,80
16	93,58 94,06	94,11	96,10
17	147,48 147,07	147,47	146,86
18	15,03 13,05	15,04	13,04
19	152,97 147,81	152,91	147,73
20	146,37 143,14	146,39	143,09
21	195,94 190,75	195,92	190,63
22	168,37 168,17	168,39	168,17
OCH_3	50,70 50,66	50,86	50,73

Kesimpulan

Telah dapat diidentifikasi komponen utama fraksi aktif etil asetat basa dari daun *Anthocephalus cadamba* Miq. , sebagai berikut:

1. Senyawa murni A_1 sebagai asam ursolat (triterpenoid pentasiklik), yang menunjukkan aktivitas sitotoksik dengan nilai LC_{50} 26,24 µg/ml, dengan struktur kimia seperti dibawah ini.



2. Senyawa A_2 yang merupakan campuran senyawa alkaloid valesiakotamin dan isovalesiakotamin dengan LC_{50} > 1000 µg/ml.

Acknowledgement

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Drs. Rusdi Tamin atas identifikasi tumbuhan *Anthocephalus cadamba* Miq., Dr. Deddi Prima Putra yang telah membantu selama penelitian di Laboratorium Penelitian Farmasi FMIPA Univ. Andalas, Prof. M. V. Sargent dan Dr. Dachriyanus, Apt. yang telah membantu pengambilan spektrum RMI di University of Western Australia serta TMPD dan Proyek URGE Hibah Tim Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi yang telah memberikan bantuan biaya pendidikan dan penelitian.

Daftar Pustaka

Agusta, A. 1997. Steroida dari Kulit Batang *Anthocephalus cadamba* Miq (Rubiaceae) Jurnal Penelitian Andalas. 23 : 70-77.

Arbain, D, D. Susanti, S. Gemala, M. Taher, M. H. Mukhtar and M. V. Sargent. 1998. The Alkaloids. Of Three *Ophiorrhiza* species. *ACGC Chemical Res Commun*. 7: 44-47.

Burkill, I. H. 1966. A Dictionary of the Economic Product of the Malay Peninsula. Government of Malaysia and Singapore by the Ministry of Agriculture and Cooperative, Kualalumpur.

Kriwacki, R. W., and T. P. Pitner. 1989. Current Aspects of Practical Two-Dimensional (2D) Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy : Applications to Structure Elucidation, *Pharm. Res.*, 6 (7) : 531-553

Meiyanto, E., dan Sugiyanto. 1997. Uji Toksisitas Beberapa Fraksi Ekstrak Etanol Daun *Gynura procumbens* (Lour) Merr terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. Majalah Farmasi Indonesia. 8 : 42-49.

Meyer, B. N., N. R. Ferrigni., J. E. Putnam., L. B. Jacobsen., D. E. Nichols., and J. L. McLaughlin. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassays for Active Plant Constituents.*Planta Med.* 45 ; 31-34.