ISOLASI KOMPONEN UTAMA FRAKSI AKTIF FARMAKOLOGIS DARI TUMBUHAN PITALO (*Clerodendron siphonanthus* R.Br.)

Irma Mon*, M. Husni Muchtar**, Amri Bakhtiar* *dan* ***Dayar Arbain*****

*) Program Pascasarjana Kimia, Universitas Andalas
**) Jurusan Farmasi, FMIPA , Universitas Andalas

ABSTRACT

Clerodendron siphonanthus R.Br. known in West Sumatera as "pitalo" is traditionally used for treatment of rheumatics, asthma and urinary tract disorder. Two flavonoids have been isolated from acid insoluble fraction of its methanolic extract which showed significant pharmacological activities on Hippocratic test. Based on their spectroscopic data, the less polar component was identified as hispidulin (I) (M.P. 235 – 237° C) and the more polar one as scutellarein (II) (M.P. 265 – 270°C). Hispidulin at the dose of 20 mg/kg bw showed CNS depressant activity (16,45 %) while scutellarein at the dose of 20 mg/kg bw showed vasoconstriction (33,33%), sympathomimetic (16,66%), muscle relaxant (16,35%) and CNS depressant (13,85%)

PENDAHULUAN

Sumatra Barat merupakan daerah yang subur dan kaya dengan berbagai jenis tumbuhan. Sebagian tumbuhan tersebut telah digunakan oleh penduduk sebagai bahan obat tradisional. Penggunaan tumbuhan sebagai obat tradisional ini masih didasarkan pada dugaan-dugaan dan pengalaman perorangan yang belum dicatat dengan baik dan belum didukung oleh penelitian ilmiah.

Sebagai kelanjutan dari kajian-kajian terdahulu terhadap kandungan senyawa aktif biologis tumbuhan Sumatra (Arbain, 1998) yang pendekatannya antara lain dilakukan melalui pendekatan Etnobotani, telah ditemukan tumbuhan yang di berbagai daerah Sumatera Barat dikenal dengan nama tumbuhan "pitalo" (*Clerodendron siphonanthus* R.Br. , *Verbenaceae*). Tumbuhan ini ditemukan tumbuh secara liar di tepi sawah, kebun dan jalan-jalan desa dan secara tradisional digunakan untuk pengobatan infeksi saluran kencing, radang kandung kemih, reumatik dan asma (Wijayakusuma, 1993). Tumbuhan ini juga digunakan sebagai bahan sayuran dan banyak dijual di pasar-pasar.

Hasil pemeriksaan pendahuluan terhadap metabolit sekunder tumbuhan ini memperlihatkan reaksi positif dengan pereaksi Mayer, Liebermann-Burchard dan besi (III) klorida yang merupakan indikasi adanya alkaloid, steroid dan senyawa fenolik sedangkan skrining hippokratik dari ekstrak metanol memperlihatkan efek relaksasi otot yang cukup dominan. Dari penelusuran literatur terlihat belum ada laporan tentang kajian kandungan kimia ataupun bioaktivitas dari tumbuhan ini. Disini akan dilaporkan isolasi, karakterisasi dan uji aktifitas farmakologis komponen utama aktif farmakologis yang ditemukan dalam daun *Clerodendron siphonanthus R.Br* ini.

BAHAN DAN METODA.

Bahan dan alat.

Bahan yang digunakan adalah: air suling, anhidrida asetat, asam sulfat pekat, besi (III) klorida, heksana, metanol, etilasetat, butanol, kloroform, logam magnesium, pereaksi Mayer, pereaksi Liebermann-Burchard, natrium bikarbonat, natrium sulfat anhidrat, plat KLT silika gel GF_{254} (Merck 5554), silika gel 60 (Merck 7743), spektrofotometer UV-Vis (Secoman 2000), spektrofotometer inframerah (Perkin Elmer 735B), spektrometer resonansi magnit inti ^1H dan ^{13}C RMI (Bruker ARX-300 masing-masing pada daerah operasi 300 dan 75 MHz dalam D_6DMSO) dan alat pengukur titik leleh Fisher Melting Point dan tidak dikoreksi.

Ekstraksi dan fraksinasi

Daun tumbuhan "pitalo" (*Clerodendron siphonanthus* R.Br.) untuk penelitian ini dikumpulkan dari daerah Siteba, Padang pada bulan

Februari 1998. Spesimen herbarium disimpan di Herbarium Universitas Andalas (ANDA) dengan nomor koleksi *Irma Mon 01*.

Daun segar yang telah dirajang halus sebanyak 11 kg dimaserasi dengan metanol (20 *l*) selama 5 hari dan proses ini diulangi dua kali. Ekstrak metanol yang didapat digabung dan dipekatkan *in vacuo* hingga diperoleh ekstrak kental *ca* 1,5 *l*. Ekstrak kental yang diperoleh ini diencerkan dengan asam asetat 10 % sampai volume 2 *l*, dienapkan semalam dan didekantasi dan diperoleh fraksi yang larut dalam asam dan yang tidak larut dalam asam (400 g).

Isolasi

Efek farmakologis nyata diperlihatkan oleh fraksi metanol yang tidak larut dalam asam. Fraksi yang tidak larut dalam asam ini (20 g) dilarutkan dengan metanol (200 ml). Kemudian diekstraksi dengan heksan (3 x 100 ml) yang ternyata tidak memperlihatkan aktifitas farmakologis. Fraksi metanol ditambah dengan air (100 ml) dan diekstraksi kembali dengan EtOAc (4 x 100 ml). Fraksi EtOAc ini memperlihatkan aktifitas farmakologis nyata pada skrining hippokratik, diuapkan *in vacuo*, diperoleh fraksi semipolar (6,12 g). Fraksi ini (6 g) dipreadsorbsi dengan silika gel (6 g) dan dikromatografi kolom dengan silika gel (35 g) dengan campuran pengelusi heksan-EtOAc (1 :1, 1 : 2, 1 : 4), EtOAc, dan EtOAc-MeOH (9 : 1) masing-masing 100 ml dan fraksi eluat yang keluar dari kolom ditampung (*ca.* 10 ml) dan dimonitor dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Fraksi yang memberikan pola KLT sama digabung dan diuapkan (71-84 (1,51 mg), 85-98 (1,02 mg), dan 99-134 (0,26 mg). Fraksi yang paling non-polar (71-84) dikromatografi dengan sephadex LH20 dan dielusi dengan metanol, fraksi (5-8) yang memberikan satu noda dominan, digabung, diuapkan dan direkristalisasi dengan metanol-EtOAc dan didapat senyawa **6-metilskutellarein (hispidulin) (I)** berbentuk padatan kristal plat bewarna kekuningan (19 mg, T.L. 235–237 °C)

Fraksi selanjutnya (9-26) digabung, dikromatografi kembali dengan sephadex LH 20 dengan pelarut metanol, didapat dua fraksi utama, fraksi yang kurang polar yang terdiri dari satu noda utama, digabung, diuapkan dan direkristalisasi dengan metanol-EtOAc didapat lagi senyawa hispidulin (10 mg). λ_{max} 275 dan 333 nm (MeOH) yang dengan penambahan natrium hidroksida bergeser batokromik pada pita I 60 nm dengan intensitas menaik, dan terbentuk pita baru pada 328 nm. Penambahan alumunium klorida menyebabkan terjadinya pergeseran

batokromik 20 nm pada pita I, dengan penambahan asam klorida dan asam borat tidak terjadi pergeseran yang berarti pada pita I.

ν_{KBr} 3400 ,1620, 1546, 1513, 1180 dan 828 cm^{-1} , **^{1}H RMI** (300 MHz, D_6DMSO, δ ppm): 13,07 (1H, s, H_5) , 7,92 (2H, d, J 8,81 Hz, H_2 and H_6), 6,91 (2H, d, J 8,78 Hz ,H_3' dan H_5',) 6,76 (1H, s ,H_8), 6,58 (1H, s, H_3) dan 3,73 ppm (3H, s, OCH_3).
^{13}C-RMI (75 MHz, D_6DMSO, δ ,ppm): 182,12 (C_4) ,163,79 (C_6), 161,17 (C_8), 157,28 (C_4'), 152,78 (C_2) , 152,38 (C_9), 131,33 (C_6), 128,47 (C_2') dan (C_6'), 121,20 (C_1'), 115,95 (C_3') dan (C_5') , 104,05 (C_{10}), 102,36 (C_3') 94,23 (C_8) dan 59,94 (C-O-$\underline{C}H_3$)

Fraksi yang lebih polar digabung, diuapkan dan direkristalisasi dengan metanol-EtOAc menghasilkan **skutellarein (II)** (19 mg, TL : 265 - 267 ^{0}C), λ_{max} : 288 dan 355 nm (MeOH) yang bergeser dengan penambahan pereaksi geser NaOH, NaOAc, $AlCl_3$, dan H_3BO_3 dengan pola yang sangat mirip dengan **(I)** , ν_{KBr} : 3406, 1621, 1367, 1251, 1085, dan 813 cm^{-1}. **^{1}H RMI**, (δ, ppm), 12,8 (1H, s, H5), 7,91 (2H, d, J 8,8 Hz, H_2' dan H_6'), 6,91 (2H, d, J 8,8 Hz, H_3' dan H_5') , 6,74 (1H, s, H_8), 6,57 (1H, s, H_3), **^{13}C-RMI** (DMSO, 75 MHz) (δ, ppm): 182,04 (C_4), 163, 52 (C_7), 161,01 (C_5), 153,37 (C_2') , 149,69 (C_2) , 147,05 (C_9), 129,17 (C_6), 128,38 (C_2' dan C_6') , 121,49 (C_1') , 115,97 (C_3' dan C_5') , 103,99 (C_{10}), 102,28 (C_3) dan 93,88 (C_8).

Skrining Hippokratik

Dilakukan menurut metoda Thomson (1985) dengan menggunakan mencit putih sehat ber umur ± 2 bulan dengan berat badan ± 20g dan telah diaklimatisasi selama seminggu. Sampel ekstrak , hasil fraksi dan senyawa hasil isolasi disuspensikan dalam larutan 2% tween 80 dalam larutan natrium klorida fisiologis dengan dosis masing-masing 1 g/kgBB, 0,5 g/kg BB dan 20 mg/kgBB. Masing-masing sampel diijeksikan secara intraperitonial (ip) selanjutnya respon yang terjadi pada hewan percobaan diamati pada 5,10, 15 dan 30 menit dan 1,2,3,24 dan 48 jam setelah pemberian sampel dan dicatat skor efek yang ditimbulkan sesuai dengan kriteria dan paramater yang telah ditentukan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pemeriksaan pendahuluan kandungan metabolit sekunder tumbuhan ini menunjukkan adanya senyawa alkaloid, fenolik, steroid dan flavonoid. Diperkirakan keberadaan berbagai jenis kandungan metabolit sekunder ini akan menyebabkan adanya penggunaan tradisional dari tumbuhan tersebut dan sekaligus akan berhubungan langsung dengan aktifitas farmakalogisnya.

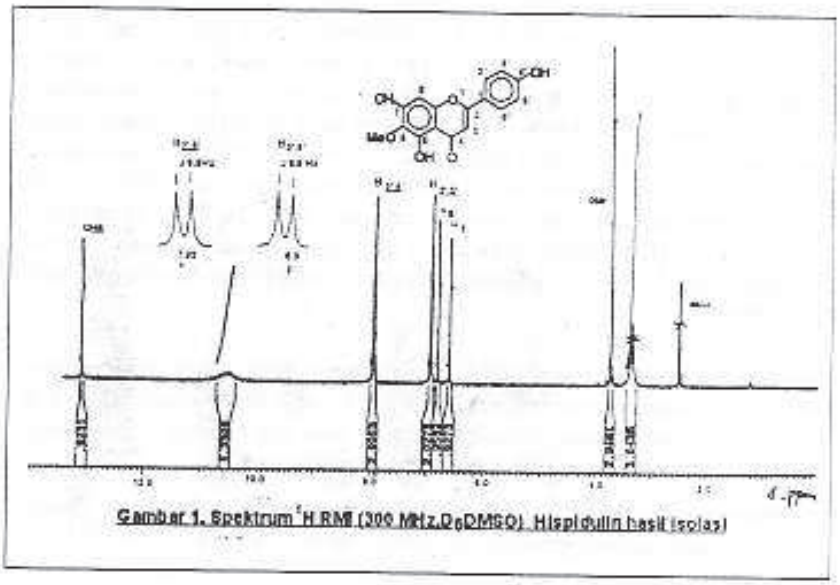
Penapisan Hippokratik (Thomson, 1985) terhadap fraksi-fraksi ekstrak metanol memperlihatkan bahwa hanya fraksi yang tidak larut asam memperlihatkan aktifitas nyata seperti penekanan susunan saraf pusat dan relaksasi otot yang dapat diamati dengan timbulnya gejala seperti penurunan aktifitas motorik, laju pernafasan menurun, rasa ingin tahu menurun. Efek lain yang terlihat jelas adalah melebarnya pupil, ekor naik, gerak berputar, reaksi plat panas dan reaksi jepit ekor turun yang merupakan efek analgetik. Gejala lain yang dapat diamati adalah gejala gerak berputar, ekor bergerak, tonus tubuh meningkat dan rasa ingin tahu meningkat yang merupakan efek adanya rangsangan SSP serta terlihatnya efek bulu berdiri yang merupakan gejala aktifitas simpatomimetik. Dengan cara ini terlihat fraksi tidak larut asam memperlihatkan efek relaksasi otot (16,98%) dan penekanan SSP (11,54%) sedangkan 6-metilskutellarein (hispidulin) **(I)** memperlihatkan aktifitas utama penekanan SSP (16,45%) sedangkan skutellarein **(II)** memperlihatkan aktifitas vasokonstriksi (33%), relaksasi otot (16,35%), simpatomimetik (16,66%) dan penekanan SSP (13,82%).

Analisis komponen fraksi aktif farmakologis yang tidak larut dalam asam ini dengan kromatografi lapis tipis memperlihatkan adanya 2 komponen utama yang bereaksi dengan besi (III) klorida disamping memberikan reaksi (+) dengan pereaksi sianidin test.

Senyawa hasil isolasi yang kepolarannya lebih kecil **(I)** dalam metanol memberikan serapan ultraviolet pada 275 (pita II) dan 333 nm (pita I) merupakan karakteristik kerangka flavon. Dengan pereaksi geser natrium hidroksida terjadi pergeseran batokromik pita I 60 nm dengan intensitas menaik merupakan indikasi adanya subtitusi hidroksil pada $C_{4'}$ sedangkan terbentuknya pita baru pada 328 nm merupakan karakteristik adanya substitusi gugus hidroksil pada C_7. Penambahan alumunium klorida menyebabkan terjadinya pergeseran batokromik 20nm pada pita I yang merupakan indikasi adanya substitusi hidroksil pada C_6 dan oksigenasi atom C_5, yang dengan penambahan asam

klorida tidak menimbulkan terjadinya pergeseran yang berarti menunjukkan tidak adanya substitusi *orto*-dihidroksil pada cincin B. Dengan penambahan asam borat juga tidak terjadi pergeseran pada pita I yang mengindikasikan tidak adanya substitusi *orto*- dihidroksil pada cincin A dan B ini. Dari data spektroskopi ultraviolet ini telah bisa disimpulkan bahwa senyawa hasil isolasi ini merupakan suatu senyawa flavonoid yang memiliki kerangka flavon dengan satu substitusi gugus hidroksil pada C_4'cincin A dan adanya substitusi dihidroksil pada posisi C_5 dan C_7.

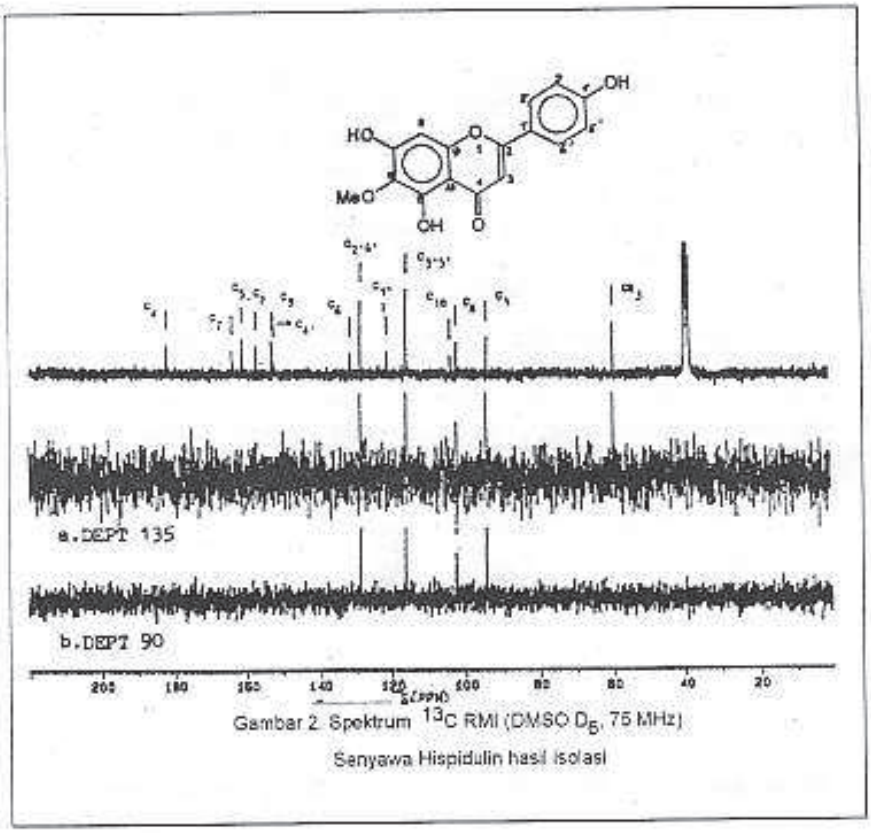
Keberadaan gugus-gugus hidroksil terlihat nyata dengan adanya serapan yang intensif dan lebar pada spektrum inframerah pada 3400 cm^{-1} sedangkan keberadaan kerangka flavon ini terlihat juga dengan adanya serapan karbonil tajam dan intensif pada 1620 cm^{-1} (Mabry, 1970)



Gambar 1. Spektrum ^{1}H RMI (300 MHz,D_6DMSO) Hispidulin hasil isolasi

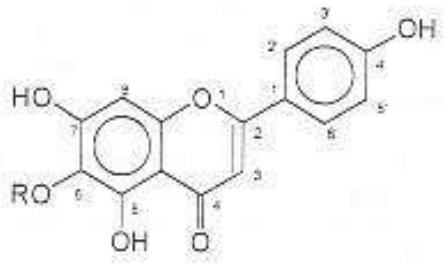
Perkiraan diatas ternyata cocok dengan data proton resonansi magnit inti (gambar 1) dimana sinyal pada 13,07 ppm (1H,s) merupakan karakeristik adanya gugus hidroksil yang terikat pada atom C_5 dimana atom hidrogennya terikat dengan atom oksigen karbonil yang terikat pada atom C_4 dengan bentuk ikatan hidrogen. Sinyal pada 7,92 ppm (2H, d, J 8.80 Hz) yang terkopling dengan sinyal pada 6,91 (2H, d, J 8,8

H_2) berturut-turut merupakan **sinyal** yang berasal dari $H_{2'}$ dan $H_{6'}$ yang ekivalen dan terkopling orto dengan $H_{3'}$ dan $H_{5'}$. Sinyal pada 6,76 ppm (1H,s) merupakan karakteristik sinyal proton H_3 dari suatu kerangka flavon. Sinyal pada 3,73 ppm (3H,s) merupakan sinyal dari gugus metoksil yang berasal dari oksigenasi atom C_6 . Data ^{13}C RMI (DEPT) (gambar 2) mengkonfirmasi perkiraan sebelumnya bahwa senyawa ini adalah flavon yang tersubstitusi dengan hidroksil pada atom C4', C_5 dan C_7 dan oleh gugus metoksi pada C_6 atau 6-metoksi-5,7,4'-trihidroksiflavon yang identik dengan6-metilskutelarein (hispidulin) **(I)** (Markham, 1988) yang sebelumnya juga telah ditemukan pada tumbuhan *Ambrosia hispida* , *Iva frutescens* (Compositae), dan *Digitalis lanata* (Scrophulariaceae) (Harborne,Mabry and Mabry, 1975)



Gambar 2. Spektrum ^{13}C RMI (DMSO D_6, 75 MHz)

Senyawa Hispidulin hasil isolasi



(I). R = OMe
(II). R = H

Senyawa yang lebih polar skutellarein **(II)** memberikan data spektroskopi yang sangat mirip dengan senyawa 6-metilskutellarein (hispidulin) **(I)**, *kecuali* tidak terlihatnya sinyal proton metoksil pada daerah sekitar 3,73 ppm yang sekaligus mengindikasikan bahwa senyawa ini sama dengan senyawa **(I)** tanpa adanya gugus OCH_3 yang terikat pada atom C_6 yang merupakan 5,6,7,4'-tetrahidroksi flavon (skutellarein) **(II)**. Senyawa ini sebelumnya juga telah ditemukan pada tumbuhan *Scutellaria* spp (Harborne, Mabry and Mabry, 1975).

Penapisan hippokratik terhadap senyawa 6-metilskutelarein (hispidulin) memperlihatkan aktifitas yang menonjol penekanan susunan saraf pusat, sedangkan skutelarein memberikan aktifitas dengan spektrum lebar seperti vasokonstriksi, simpatomimetik, relaksasi otot dan penekanan susunan saraf pusat. Masih diperlukan kajian-kajian bioaktifitas yang lebih terinci untuk dapat memahami penggunaan tradisional tumbuhan ini.

Acknowledgement

We are grateful to Mr. Rusjdi Tamin for identifying the plant specimen, and Department of Education and Culture of Republic of Indonesia for Grant "Hibah Tim" No. 002/HTPP-H/URGE/1996.

DAFTAR PUSTAKA

Arbain, D., Dachriyanus and M.V. Sargent, The Alkaloids of *Ophiorrhiza blumeana*, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1998, 2537-2540.

Harborne, J.B. T.J. Mabry, and H. Mabry, (Ed.) (1975), The Flavonoids, Chapman and Hall, London.

Mabry, T.J., K.R. Markham and M.B. Thomas, 1970, The Systematic Identification of Flavonoids, Springer-Verlag, New York, Heilderberg, Berlin.

Markham, K.R. 1998, Techniques of Flavonoid Identification, (Cara Mengidentifikasi Flavonoid), Terjemahan oleh K. Padmawinata, Penerbit ITB Bandung.

Thomson, E.B., 1985, Drug Bioscrening, Fundamental of Drug Evaluation Techniques in Pharmacology, Craceway Publishing Company, New York.

Wijayakusuma, H., 1993, Tanaman Berkhasiat Obat Di Indonesia, Pustaka Kartini.