

Eksplorasi Tumbuhan dari Hutan Kalimantan Tengah sebagai Sumber Senyawa Bioaktif

Exploration of Central Kalimantan's forest plants as bioactive compound resources

MAE SRI HARTATI WAHYUNINGSIH^{1*}, SUBAGUS WAHYUONO², DJOKO SANTOSA², JUSAIN SETIADI², SOEKOTJO³, SITI MUSLIMAH WIDIASTUTI³, RITA RAKHMAWATI⁴, DINAR SARI CAHYANINGRUM WAHYUNI⁴

¹Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada (UGM), Yogyakarta 55281.

²Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada (UGM), Yogyakarta 55281.

³Fakultas Kehutanan, Universitas Gadjah Mada (UGM), Yogyakarta 55281.

⁴Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Sebelas Maret Surakarta 57126.

Diterima: 25 Januari 2008. Disetujui: 2 Mei 2008.

ABSTRACT

The width of the forest area of Indonesia is about 75% of the entire land which has not been optimally utilized as a raw medicinal resource. The forest area is rich in plants of various medicinal benefits which have not been found out and developed. The aim of the study was to explore Central Kalimantan's forest plants as bioactive compound resources. Using Brine Shrimp Lethality Test (BST) method the exploration was conducted on 70 kinds of plants which had been traditionally used in that area. The dry powder was macerated in chloroform and then in methanol in order to obtain 140 chloroform and methanol extracts, each 70 extracts respectively. The activities of those extract were tested on 500 dan 1000 µg/mL of their concentration. The result was analyzed using probit regression in order to obtain LC₅₀ value. The result of the study indicated that from those 140 extracts, were obtained 70 active extracts (100% dead larva *Artemia salina*) in their concentration of 500 µg/mL. Concentration decreasing up to 100 µg/mL produced 10 active extracts (100% dead larva *A. salina*) which potential developed as bioactive compound resources.

© 2008 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

Key words: Central Kalimantan, plant exploration, bioactive compound, Brine Shrimp Lethality Test.

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara kepulauan terbesar di dunia yang memiliki lebih dari 17.000 pulau dengan panjang garis pantai mencapai 81.000 km, dan membentang antara garis 95-145° BT dan 6° LU-11° LS (Anonim, 2002). Indonesia termasuk dalam daftar negara megabiodiversitas. Pemanfaatan biodiversitas untuk kesejahteraan telah dilakukan secara tradisional, historikal maupun melalui aplikasi teknologi modern, namun masih banyak potensi hutan yang belum digali untuk dikembangkan sebagai sumber fitofarmaka atau obat modern (Ohlstein *et al.*, 2000).

Luas hutan Indonesia kurang lebih masih 75% dari seluruh wilayah daratan dan belum dimanfaatkan secara optimal sebagai sumber obat. Potensi hutan dicirikan keanekaragaman vegetasi sebagai sumberdaya paling dominan dari komponen hutan, yang memiliki beragam fungsi dan mudah digunakan. Pendekatan ekologi dalam pemeliharaan kawasan hutan di Indonesia sulit dilakukan karena hutan masih merupakan sumber kayu yang menjadi penyumbang devisa andalan dan sumber pendapatan masyarakat. Oleh karena itu diperlukan strategi

pengelolaan hutan yang bernilai ekonomi tinggi dan berwawasan lingkungan (Rijai, 2003).

Secara filosofi potensi sumberdaya bahan alam dalam kehidupan manusia tergantung pada jumlah dan jenis kandungan senyawa kimianya. Sumber daya hayati yang digunakan sebagai obat-obatan, agrokimia, dan material sains umumnya mengandung alkaloid, terpenoid, flavanoid, dan senyawa fenol lainnya. Variasi dan komposisi senyawa-senyawa tersebut menjadikan sumberdaya hayati bernilai ekonomi, tetapi nilai ekonomi itu pula yang memicu kerusakannya karena dimanfaatkan atau dieksploitasi secara berlebihan (Rijai, 2003).

Potensi senyawa alam kawasan hutan tropis Indonesia belum dimanfaatkan dengan baik. Pemanfaatan secara tradisional seperti untuk obat tradisional sudah dilakukan, namun penggalian dan pengembangan lebih lanjut belum banyak dilakukan. Tumbuhan di hutan-hutan Kalimantan Tengah merupakan salah satu sumber senyawa bioaktif yang belum banyak diungkapkan. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan eksplorasi tumbuhan asal hutan Kalimantan Tengah sebagai sumber senyawa bioaktif menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST).

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan tumbuhan dikoleksi dari kawasan hutan lindung Sari Bumi Kusuma, Kalimantan Tengah, diambil pada bulan

▼ Alamat Korespondensi:

Bagian Farmasi Kedokteran, Fakultas Kedokteran, UGM Yogyakarta 55281,
Tel.: +62-274-90 2477; Fax.: +62-274-581876
E-mail: maeshw98@yahoo.com

Oktober 2003. Bahan lain yang diperlukan mencakup kloroform, etil asetat, n-heksana, metanol berderajat pro analisis (E. Merck); air laut buatan dengan kadar garam 20%, telur *Artemia salina* Leach, suspensi ragi (Fermipan®), silika gel GF254 (E. Merck), cerium (IV) sulfat (E. Merck), reagen dragendorff (E. Merck), dan akuades. Alat yang digunakan mencakup rotavapor, corong buchner, mikropipet, lampu (40 watt), aerator, mikrosiring, oven, alat penyemprot bercak, dan lampu UV.

Pengambilan sampel dan identifikasi

Pemilihan dan pengambilan sampel dilakukan berdasarkan informasi dari masyarakat dan pengobat tradisional setempat. Bagian tumbuhan yang diambil adalah daun, batang, akar, bunga, dan seluruh bagian tumbuhan. Tumbuhan dipotret sebelum dan sesudah dikoleksi, lalu dikeringkan dan disimpan dalam kantong kertas yang diberi nomor dan tanggal koleksi. Untuk setiap jenis tumbuhan diberi kode 03 bfar 001, 03 bfar 002, 03 bfar 003, dan seterusnya. Informasi yang diperoleh dari masyarakat maupun pengobat tradisional dicatat. Setiap jenis tumbuhan yang dikoleksi, sebagian kecil disimpan sebagai spesimen, lalu dilakukan determinasi berdasarkan spesimen dan foto (Backer and Van den Brink, 1968). Determinasi tumbuhan dilakukan di Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, UGM Yogyakarta.

Pembuatan serbuk, ekstrak dan larutan stok

Tujuh puluh tumbuhan yang telah diketahui jenisnya dikeringkan pada suhu 50°C, lalu dibuat serbuk dengan cara diblender. Selanjutnya 100 g serbuk kering dimaserasi dengan kloroform (300 mL) selama 24 jam sambil diaduk-aduk, kemudian disaring menggunakan corong buchner. Sari diuapkan dan residu diperlakukan dengan cara yang sama sampai tiga kali. Ekstrak kloroform yang diperoleh kemudian digabung dan diuapkan sampai kental. Residu yang telah bebas kloroform dimaserasi dengan metanol (300 mL) selama 24 jam, kemudian disaring. Residu diperlakukan dengan cara yang sama sampai tiga kali. Ekstrak metanol yang diperoleh kemudian digabung dan diuapkan sampai kental. Setelah itu, masing-masing ekstrak ditimbang sebanyak 50 mg, dilarutkan dengan campuran kloroform-metanol (1:1) sebanyak 5 mL, sehingga diperoleh larutan stok 10 mg/mL.

Penetasan larva Artemia salina

Telur *A. salina* ditaburkan pada wadah berisi akuades, lalu ditiriskan sampai airnya tuntas, kemudian ditempatkan pada wadah gelap dari aquarium berisi air laut buatan yang diberi aerasi. Wadah atau aquarium yang digunakan dibagi dengan sekat menjadi dua bagian, bagian gelap dan terang. Telur akan menetas setelah 24 jam dan akan menuju daerah terang melalui sekat. Larva yang sehat bersifat fototropik dan siap dijadikan hewan uji setelah berumur 48 jam.

Pengujian sampel dan analisis hasilnya

Seri konsentrasi sampel dibuat dengan mengambil volume tertentu dari larutan stok dan dimasukkan dalam flakon yang berisi larutan sampel dengan konsentrasi 500 dan 1000 µg/mL, masing-masing dalam 5 flakon. Kontrol dibuat hanya dengan pelarut saja. Pada setiap flakon yang pelarutnya telah diuapkan, dimasukkan kurang lebih 1 mL air laut dan divortex. Sepuluh ekor larva *A. salina* (umur 48 jam) dimasukkan dan ditambahkan air laut sampai volume 5 mL serta 1 tetes suspensi ragi yang dibuat dengan melarutkan 3 mg ragi dalam 5 mL air laut. Flakon-flakon

diletakkan di bawah penerangan dan setelah 24 jam jumlah larva yang mati dihitung. Hasil penelitian dianalisis menggunakan regresi probit sehingga diperoleh harga LC₅₀.

Kromatografi lapis tipis

Ekstrak teraktif ditotolkan pada lempeng silika gel GF254 dan dikembangkan dengan fase gerak yang sesuai. Hasil pengembangan dideteksi dengan sinar UV 254 nm dan UV 366 nm, serta dragendorff dan cerium (IV) sulfat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengumpulan bahan

Pemilihan dan pengambilan sampel di hutan dilakukan berdasarkan informasi dari masyarakat dan pengobat tradisional setempat. Tumbuhan yang telah dikumpulkan sebanyak 70 spesies, sebanyak 12 spesies di antaranya memiliki bioaktivitas.

Ekstraksi dan uji aktivitas dengan BST

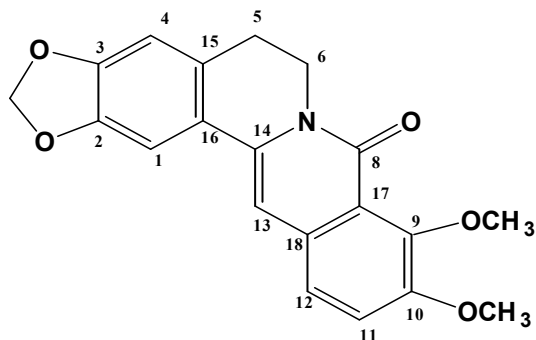
Bahan yang telah dikoleksi sesegera mungkin dikeringkan dengan cara dijemur dan ditutup menggunakan kain hitam atau dimasukkan dalam oven dengan suhu 50-60°C. Hal ini dilakukan untuk menghindari kemungkinan adanya kerusakan pada kandungan senyawa tanaman. Setelah kering dilakukan penyerbukan agar permukaan sampel yang disari dapat terendam secara merata, sehingga proses penyarian dapat berlangsung lebih sempurna. Sampel direndam selama 24 jam sambil diaduk sesekali supaya permukaan sampel tersari secara merata (Harborne, 1987).

Dalam penelitian ini proses maserasi dilakukan tiga kali dengan kloroform, dilanjutkan tiga kali dengan metanol. Penyarian dengan kloroform dimaksudkan untuk menyari senyawa-senyawa yang bersifat nonpolar, sedangkan penyarian dengan metanol dimaksudkan untuk menyari senyawa-senyawa yang bersifat lebih polar. Penyaringan dilakukan menggunakan kertas saring Whatman No.1 yang dibantu dengan alat vakum, sehingga diperoleh filtrat yang lebih cepat. Selanjutnya filtrat yang diperoleh ditampung dalam wadah dan diuapkan menggunakan rotaevaporator sampai pelarut yang ada berkurang banyak. Filtrat dituang dalam cawan porselin, kemudian diuapkan lebih lanjut menggunakan kipas angin. Untuk menghilangkan sisa pelarut (kloroform dan metanol) sisa residu diletakkan 24 jam di desikator dengan pengering.

Setiap ekstrak yang diperoleh dianalisis kandungan kimianya menggunakan metode kromatografi lapis tipis. Ekstrak kloroform dan metanol dari tanaman yang sama di elusi menggunakan sistem fase diam dan fase gerak yang sama pada kondisi bejana yang sama pula. Hal ini dilakukan untuk mengetahui apakah proses maserasi yang dilakukan sudah sempurna, ditandai oleh munculnya bercak yang berbeda pada kromatogram KLT untuk masing-masing ekstrak. Sebagai contoh, sampel dengan kode 03 bfar 023 yang dielusi menggunakan fase gerak n-heksana:EtOAc (4:1 v/v) memberikan pemisahan yang baik dengan munculnya bercak dengan R_f yang berbeda pada ekstrak CHCl₃ dan MeOH. Pengambilan contoh pada sampel dengan kode 03 bfar 023 karena kedua ekstrak dari sampel tersebut, baik CHCl₃ maupun MeOH, mempunyai aktivitas yang sama terhadap larva *A. salina*, baik pada konsentrasi 500 µg/mL maupun 100 µg/mL. Pada sampel lain, salah satu atau kedua ekstrak akan memperlihatkan perbedaan aktivitas pada kedua konsentrasi tersebut. Eksplorasi uji aktivitas ekstrak yang digunakan dalam

percobaan menggunakan metode BST, yaitu: suatu uji aktivitas terhadap larva *A. salina* dengan menghitung jumlah/persentase kematian larva udang seperti yang digunakan oleh Meyer *et al.* (1982). Metode ini telah banyak dikembangkan sebagai salah satu cara penentuan bioaktivitas ekstrak tumbuhan maupun senyawa murni. Meyer *et al.*, (1982) menyatakan bahwa suatu senyawa dikatakan toksik/aktif apabila mempunyai nilai LC_{50} di bawah 1000 $\mu\text{g/mL}$. *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) digunakan sebagai metode *guided bioassay* dalam melakukan eksplorasi beberapa tanaman ini karena pelaksanaannya mudah, murah dan hasilnya representatif (Meyer *et al.*, 1982; Carballo *et al.*, 2002).

Eksplorasi terhadap 140 ekstrak yang diuji menggunakan metode BST menunjukkan bahwa pada dosis 500 $\mu\text{g/mL}$, 17 ekstrak menunjukkan aktivitas terhadap larva *A. salina* dengan tingkat kematian 100%. Dari jumlah tersebut, pada dosis 100 $\mu\text{g/mL}$ sebanyak 10 ekstrak menunjukkan tingkat kematian 100% terhadap larva *A. salina*. Salah satu sampel yang sangat menarik perhatian adalah sampel dengan kode 03 bfar 023. Pada konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$ maupun 100 $\mu\text{g/mL}$ kedua ekstrak (kloroform dan metanol) dari sampel tersebut menunjukkan aktivitas yang sama, yakni menyebabkan kematian 100% terhadap larva *A. salina* (Tabel 1.). Profil kromatogram KLT kedua ekstrak tersebut berbeda, sehingga dapat dipastikan senyawa yang tersari juga berbeda. Berarti tumbuhan tersebut mengandung senyawa-senyawa yang berbeda, tetapi memiliki aktivitas yang sama yakni mampu mematikan hewan uji baik pada konsentrasi tinggi maupun rendah. Sampel lainnya yang juga menarik perhatian adalah sampel dengan kode 03 bfar 029. Sampel ini mempunyai nama daerah akar kuning atau *Fibraurea chloroleuca* Miers. Tumbuhan ini banyak ditemukan di Thailand, Vietnam, Kalimantan, Sulawesi, dan Maluku (Sitepu, 2001). Masyarakat Dayak di Kalimantan menggunakan tumbuhan ini sebagai obat sakit perut, obat tetes mata serta obat sakit kuning (Sitepu, 2001; Duke, 1985). *F. chloroleuca* mempunyai kandungan alkaloid yang banyak terdapat di dalam batang, akar dan daun. Penelitian Manaf *et al.* (2002) menunjukkan bahwa alkaloid pada batang dan akar *F. chloroleuca* berjenis sama. Tumbuhan ini juga mengandung senyawa terpenoid, baik pada batang, daun maupun akarnya. Beberapa penelitian mengemukakan senyawa-senyawa yang terdapat pada tumbuhan *F. chloroleuca*, antara lain, berberin, yaitu: suatu alkaloid yang telah lama digunakan dalam pengobatan (Cernakova *et al.*, 2002; Anonim, 2005). Tumbuhan ini juga mengandung jathrorizin, palmitin (Anonim, 2005), dan fibleucin (Bakhari *et al.*, 1998).



Gambar 1. Struktur kimia 8-oksoprotoberberina.

Tabel 1. Persentase kematian 100% terhadap larva *A. salina* pada konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$ dan 100 $\mu\text{g/mL}$.

Sampel	Nama	Ekstrak	Konsentrasi	
			500 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
03 bfar 004	<i>Annona reticulata</i> L.	CHCl_3	+	+
03 bfar 004	<i>Annona reticulata</i> L.	MeOH	+	-
03 bfar 008	<i>Globba marantina</i> L.	MeOH	+	-
03 bfar 023	<i>Eurya nitida</i> Korth.	CHCl_3	+	+
03 bfar 023	<i>Eurya nitida</i> Korth.	MeOH	+	+
03 bfar 026	<i>Dictamnus albus</i> L.	CHCl_3	+	-
03 bfar 027	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack.	CHCl_3	+	+
03 bfar 029	<i>Fibraurea chloroleuca</i> Miers	CHCl_3	+	+
03 bfar 029	<i>Fibraurea chloroleuca</i> Miers	MeOH	+	-
03 bfar 031	<i>Pandora</i> sp.	CHCl_3	+	-
03 bfar 053	<i>Hornstedtia mollis</i> (Bl) Val.	CHCl_3	+	-
03 bfar 058	<i>Pithecellobium ellipticum</i> (Bl) Hassk.	CHCl_3	+	+
03 bfar 061	<i>Vitex pubescens</i> Vahl.	CHCl_3	+	+
03 bfar 066	<i>Calamus caesius</i> Bl.	CHCl_3	+	+
03 bfar 066	<i>Calamus caesius</i> Bl.	MeOH	+	-
03 bfar 068	<i>Cinnamomum sintoc</i> Bl.	CHCl_3	+	+
03 bfar 068	<i>Cinnamomum sintoc</i> Bl.	MeOH	+	-

Keterangan: CHCl_3 = kloroform, MeOH = metanol; + = mati, - = tidak mati.

Senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak kloroform *F. chloroleuca* dapat diisolasi menggunakan BST dengan LC_{50} sebesar 4,5 $\mu\text{g/mL}$. Senyawa bioaktif tersebut mempunyai jarak lebur yang tajam pada 182,4-183,0°C, dengan panjang gelombang maksimum 241-345 nm yang mengindikasikan bahwa senyawa tersebut mempunyai gugus kromofor. Senyawa tersebut juga memberikan reaksi positif dengan penampak bercak spesifik (dragendorf) pada KLT yang mengindikasikan bahwa senyawa tersebut merupakan alkaloid (Wahyuono *et al.*, 2006). Identifikasi senyawa bioaktif tersebut menggunakan spektroskopi (UV, IR, NMR, dan MS) dan dibandingkan dengan data spektroskopi dari literatur (Suau *et al.*, 2000) menunjukkan identitasnya sebagai 8-oxoprotoberberine (Wahyuono *et al.*, 2007) (Gambar 1.). Senyawa ini dilaporkan mampu menginterkalasi DNA (Liu *et al.*, 2002).

KESIMPULAN

Eksplorasi terhadap 140 macam ekstrak tanaman hutan Kalimantan Tengah yang di uji dengan metode BST diperoleh 17 ekstrak aktif dengan kematian larva *A. salina* 100% pada konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$. Penurunan konsentrasi ekstrak sampai 100 $\mu\text{g/mL}$, diperoleh 10 ekstrak yang poten dikembangkan sebagai sumber senyawa bioaktif.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Menteri Kehutanan RI melalui Dir Jen PHKA atas dana penelitian yang diberikan. Dinas Kehutanan (PHKA) DIY yang telah membantu pelaksanaan eksplorasi dan PT Sari Bumi Kusuma, Kalimantan atas semua fasilitas yang telah disediakan. Fakultas Farmasi dan Fakultas Kehutanan yang telah memberi ijin dan fasilitas pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2002. *Sarawak MediChem Pharmaceuticals; initiates clinical trial of calanolide-A in combination therapy for HIV*. Press release July 08, 2002, News in the world of Natural Products. <http://www.ingentaconnect.com/content/ben/cdth/2007>
- Anonim. 2005. *Ubat-ubatan Tradisional*, <http://www.lib.usm.my/press/SSU/GAEK.bm.html>
- Aspan, R., 2004. Pengembangan pemanfaatan obat alam dalam pelayanan kesehatan masyarakat. *Seminar Tanaman Obat Indonesia*, Tawangmangu, Surakarta.
- Backer, C. A., and Van den Brink, R. C. B., 1968, *Flora of Java*, volume II, p.240. NPV, Noordhoff, Groningen.
- Bakhari, N.A., S.T. Wah, K. Chinnakali, H.K. Fun, and I.A. Razak. 1998. Fibleucin from *Fibraurea chloroleuca* Miers. *Acta Crystallographica*. C54: 1649-1651.
- Luis, C.J., I.Z.L. Hernandez, P. Pilar, G.M.D. Garcia. 2002. A comparison between two brine shrimp assays to detect bioactivity in marine natural product. *BMC Biotechnology* 2: 27.
- Cernakova, M., D. Kostalove, V. Kettman, M. Pladova, J. Toth, and J. Drimal. 2002. Potential antimutagenic activity of berberin, a constituent of *Mahonia aquifolium*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2: 2.
- Duke, J.A. and E.S. Ayensu. 1985. *Medicinal Plants of China*. Algonac: MI Reference Publication, Inc.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia*. Terbitan Kedua. Penerjemah: Padmawinata, K. dan I. Sudiro. Bandung: Penerbit ITB.
- Liu, L., R.N. Warrener, and R.A. Russel. 1998. Synthesis of B-ring aromatised protoberberine-8-one-species as potential DNA intercalation units. *Electronic Conference on Heterocyclic Chemistry*, June 29-July 24. Chemistry Dept, imperial College of Science, Technology and Medicine.
- Manaf, A.J., N.A. Shah, A.A. Musa, M. Supi, and S.Z.M. So'ad. 2002. Pengecaman tumbuhan bernilai komersil di hutan simpan Universiti Teknologi MARA Cawangan Pahang serta penyaringan bahan-bahan metabolit sekundernya. *Proceeding of the Seminar on Malaysian Traditional Medicine*, University of Malaya, Kuala Lumpur, July 24-25
- Meyer, N., A.R. Ferrigni, J.E. Putnam, L.B. Jacobsen, D.E. Nicholas, and J.C. McLaughlin. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituent. *Planta Medica* 982 (45): 3-34.
- Ohlstein, E.H., R.R. Ruffolo Jr., and J.D. Elliot. 2000. Drug discovery in the next millennium. *Annual Review Pharmacology and Toxicology*. 40: 177-191.
- Rijai, L.. 2003. *Bioprospeksi suatu Paradigma Baru dalam Pengelolaan Hutan Berkelanjutan* Bogor: Program Pascasarjana S3, Institut Pertanian Bogor.
- Sitepu, D., dan P. Sutikno. 2001. Peranan tanaman obat dalam pengembangan hutan tanaman. *Bulletin Kehutanan* 2 (2): 14-18.
- Suau, R., J.M. Lopez-Romero, A. Ruiz, and R. Rico. 2000. Synthesis of homoprotoberberines and 8-oxoprotoberberines by sequential bicyclization of phenylacetamides. *Tetrahedron* 56: 993-998.
- Wahyuono, S., J. Setiadi, Dj. Santosa, M.S.H. Wahyuningsih, Soekotjo, and S.M. Widyastuti,. 2006. Potential of bioactive compound isolated from akar kuning (*Fibraurea chloroleuca* Miers.) collected from Central Kalimantan forest as anticancer. *Majalah Obat Tradisional* 11: 22-28
- Wahyuono, S., J. Setiadi, Dj. Santosa, M.S.H. Wahyuningsih, Soekotjo, and S.M. Widyastuti. 2007. Structure identification of bioactive compound isolated from akar kuning (*Fibraurea chloroleuca* Miers.) (#03-SBK-029) collected from central Kalimantan forest, *Majalah Obat Tradisional*. 11: 3-8.