

P3TIR/P.08/99

ISOLASI SENYAWA BIOAKTIF
ANTILEUKEMIA L1210 DARI KULIT
KAYU SIMALUR, *Aglaiia argentea*
(Meliaceae) I. IDENTIFIKASI SENYAWA
AGLAIN B DALAM FRAKSI ETIL,
ASETAT

Aryanti, Hendiq Winarno, Made Sumatra
dan Partomuan Simanjuntak.

ISOLASI SENYAWA BIOAKTIF ANTILEUKEMIA L_{1210} DARI KULIT KAYU

SIMALUR, *Aglaiia argentea* (*Meliaceae*) I. IDENTIFIKASI SENYAWA AGLAIN B DALAM FRAKSI ETIL ASETAT

Aryanti¹, Hendig Winarno¹, Made Sumatra¹ dan Partomuan Simanjuntak²

ABSTRAK

ISOLASI SENYAWA BIOAKTIF ANTILEUKEMIA L_{1210} DARI KULIT KAYU SIMALUR *Aglaiia argentea* (*Maliaceae*) I. IDENTIFIKASI SENYAWA AGLAIN B DALAM FRAKSI ETIL ASETAT. Dari ekstrak etilasetat kulit batang "Simalur" *Aglaiia argentea* (*Meliaceae*) telah berhasil diisolasi suatu senyawa bioaktif anti leukemia L_{1210} . Pemurnian dilakukan dengan kromatografi kolom dan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), identifikasi dilakukan berdasarkan analisis data spektrum ultralembayung, infra merah dan spektrometri massa. Senyawa yang memberikan reaksi positif terhadap reagen Dragendroff diidentifikasi sebagai suatu senyawa turunan siklopentatetrahidrobenzofuran yang berikatan dengan suatu gugus 2-aminopirolidin yang dikenal sebagai aglain B yang menyerap pada panjang gelombang 368 nm. Hasil uji bioaktivitas senyawa isolat terhadap sel leukemia L_{1210} memberikan nilai IC_{50} 0,06 ppm.

ABSTRACT

ISOLATION OF ANTILEUKEMIC L_{1210} BIOACTIVE COMPOUND FROM THE BARK OF SIMALUR *Aglaiia argentea* (*Maliaceae*) I. IDENTIFICATION OF AGLAIN B COMPOUND IN ETHYL ACETATE FRACTION. *Antileukemic L_{1210} bioactive compound has been isolated from ethyl acetate fraction of the bark of "Simalur" *Aglaiia argentea* (*Maliaceae*). Purification was conducted by column chromatography and high performance liquid chromatography (HPLC), meanwhile identification was done by UV, IR and GC-MS data analysis. The positive test of the compound on Dragendroff reagent was identified as a derived compound of siclopentatetrahydrobenzofuran and bounded with 2-aminopyrrolidin, this compound called it aglain B with maximum wave length was 368 nm. Result of the bioactivity test of isolate on leukemic L_{1210} cell was 0.06 ppm (IC_{50}).*

-
- 1) Pusat Penelitian dan Pengembangan Teknologi Isotop dan Radiasi, BTNN
 - 2) Pusat Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi, LIPI

PENDAHULUAN

Kanker adalah suatu penyakit sel dengan ciri gangguan atau kegagalan mekanisme pengatur multiplikasi dan fungsi homeostatis lainnya pada organisme multiselular. Sel kanker dianggap telah mengalami mutasi *irreversible* pada DNA-nya yang menyebabkan kelainan pada aktivitas enzim yang disintesis, dan memperlihatkan aktivitas yang berbeda dengan sel normal.

Menurut data penelitian Departemen Kesehatan RI bersama Badan Registrasi Kanker dan Ikatan Ahli Patologi serta Yayasan Kanker Indonesia menunjukkan jenis kanker yang banyak terdapat di Indonesia yaitu kanker rahim, hati, kulit, limfoma dan kanker darah atau leukemia.

Penyakit leukemia (kanker darah) ditandai dengan adanya proliferasi tak terkendali dari sel darah yang belum dewasa, akibat terjadinya fragmentasi pada kromosom nomor 21 sehingga menyebabkan hilangnya gen yang berfungsi untuk pematangan sel darah, akhirnya sel yang belum matang tersebut lepas ke dalam darah periferi dan berpotensi menjadi ganas (1). Oleh karena penyakit leukemia sangat menakutkan, maka berbagai usaha telah dilakukan orang untuk mengobati termasuk penggunaan tanaman obat.

Penggunaan tanaman *Euphorbia escula* yang mengandung senyawa eugenol benzoat untuk menghambat pertumbuhan sel leukemia telah dilakukan oleh CORDELL (2), demikian juga senyawa vinkristin dan vinblastin dari tanaman *Vinca rosea* L telah digunakan secara luas untuk pengobatan kanker. Tanaman ciplukan (*Physalis minima* L) yang mengandung senyawa pisin B, D, F dan P masing-masing memberikan aktivitas anti leukemia dengan IC_{50} 0,16; 0,46; 0,29 dan 0,14 ppm (3). Selain itu tanaman golongan *Meliaceae* seperti *Aglaia argentea* juga berpotensi sebagai tanaman obat anti leukemia.

Menurut DUMONTET et.al (4) dan OMOBUWAJO et.al (5) bagian daun dari *A. argentea* mengandung senyawa aglain A dan B yang aktif terhadap sel KB.

A. argentea adalah tanaman berdiri tegak dengan ketinggian pohon mencapai 30 m. Tanaman ini termasuk salah satu suku *Meliaceae* yang tumbuh pada tanah berbatu dan bertanah liat, hidup pada ketinggian 1200 m diatas permukaan laut dan terdapat di kepulauan Nikobar, Thailand, Indonesia yaitu Sumatra, Jawa, Sulawesi dan Kalimantan. Berdasarkan penelitian terdahulu (5) bahwa adanya potensi tanaman ini sebagai obat kanker, maka pada penelitian ini dilakukan isolasi senyawa kimia yang aktif sebagai anti leukemia L₁₂₁₀.

BAHAN DAN METODE

Bahan. Bahan tanaman yang digunakan yaitu bagian kulit batang tanaman Simalur (*Aglaiia argentea*) yang telah dikeringanginkan beberapa hari. Sedang bahan kimia yang digunakan adalah metanol, etilasetat dan *n*-heksan produksi BDH Jerman berkualitas pro analitik.

Ekstraksi dan Fraksionasi. Sebanyak 500 g kulit batang Simalur kering diekstrak dengan 1 liter etanol pada alat soxhlet bersuhu 60 °C, ekstraksi dilakukan sebanyak tiga kali sehingga seluruh komponen kimia tersari oleh pelarut, selanjutnya sisa pelarut diuapkan dengan pengering berputar sehingga diperoleh ekstrak kasar. Ekstrak kasar dimasukkan ke dalam corong pisah lalu difraksionasi dengan etil asetat : air (1 : 1), lalu dipisahkan fraksi etil asetat dipisahkan dan dikeringkan, sedangkan fraksi air ditambahkan *n*-butanol dan dikocok, kemudian masing-masing fraksi dipisahkan dan dikeringkan sehingga diperoleh fraksi etil asetat, fraksi air, dan *n*-butanol. Semua fraksi dilanjutkan uji aktivitas terhadap sel leukemia. Fraksi yang memberikan nilai inhibisi tertinggi (fraksi etil asetat) diteruskan untuk dipisahkan secara kromatografi kolom. Sebanyak 3 g fraksi etil

asetat dipisahkan secara kromatografi kolom dengan absorben silikagel F₂₅₄ dan pelarut etil asetat : *n*-heksan (4 : 1). Hasil pemisahan ini (FEA-1, FEA-2 dan FEA-3) diuji lagi terhadap sel leukemia, ternyata FEA-2 memberikan nilai inhibisi paling tinggi, sehingga diteruskan untuk pemurnian secara KCKT.

Isolasi. Hasil pemisahan dengan kromatografi kolom (FEA-2) dilanjutkan pemurnian dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) yaitu sebanyak 0,2 g sampel dilarutkan dengan pelarut metanol selanjutnya dipisahkan dengan KCKT menggunakan fasa gerak metanol, kecepatan alir 0,5 ml/menit menggunakan kolom Phenomenex C-18 pada panjang gelombang 280 nm.

Uji bioaktif terhadap sel leukemia L₁₂₁₀ . Metode pengujian keaktifan senyawa terhadap sel leukemia L₁₂₁₀ berdasarkan metode yang telah dikembangkan oleh SUMATRA (3). Sebanyak 10 µl larutan uji dengan konsentrasi bervariasi dimasukkan kedalam *multiwell plate tissue culture* yang telah berisi sel leukemia L₁₂₁₀ dengan jumlah sel 20×10^5 sel/ml dan sebanyak 10 µl metanol sebagai kontrol. Kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam dan dihitung jumlah sel yang hidup dibawah mikroskop pada pembesaran 10x. Persen inhibisi dihitung dengan cara : $1 - \alpha/\beta \times 100 \%$, α = jumlah sel yang hidup di dalam zat uji, β = jumlah sel yang hidup dalam kontrol.

Uji alkaloid. Setiap fraksi dilakukan uji adanya senyawa alkaloid yaitu dengan cara menotolkan sampel uji pada lempeng kromatografi lapis tipis silikagel F₂₅₄ lalu dielusi dengan pelarut kloroform : metanol : air = 7 : 3 : 1, *n*-heksan : etil asetat (4 : 1) untuk ekstrak kasar, fraksi air, fraksi butanol dan fraksi etil asetat. Untuk fraksi-fraksi hasil pemisahan dengan KCKT (FEA-2-1, FEA-2-2 dan FEA-2-3) dielusi dengan pelarut

metanol : kloroform (1 : 1). Semua lempeng berisi sampel uji disemprot dengan pereaksi Dragendroff dan adanya senyawa alkaloid akan memberikan bercak oranye pada spot-spot yang terpisah.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari 500 g kulit batang Simalur yang diekstrak dengan metanol diperoleh ekstrak kasar seberat 18,7518 g dan difraksinasi dengan etil asetat, air dan *n*-butanol sehingga diperoleh masing-masingnya seberat 3,8397 g, 3,5335 g dan 2,0027 g. Semua sampel diuji bioaktivitasnya terhadap sel leukemia L₁₂₁₀ dan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Aktivitas inhibisi sel leukemia L₁₂₁₀ oleh ekstrak kasar, fraksi air, fraksi butanol, bervariasi konsentrasi.

Sampel	Konsentrasi (µg/ml)	Inhibisi (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
Ekstrak kasar	50	51,11	< 50
	100	57,78	
Fraksi etil asetat	10	76,67	< 10
	25	81,11	
Fraksi butanol	10	66,25	< 10
	25	77,50	
Fraksi air	10	65,50	< 10
	25	77,50	

Hasil uji bioaktivitas keempat ekstrak (kasar, etil asetat, air dan *n*-butanol) terhadap sel leukemia L₁₂₁₀ menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memberikan persentase inhibisi yang

lebih tinggi (81,11 %), sehingga fraksi etil asetat ini diteruskan untuk pemisahan secara kromatografi kolom dengan menggunakan pelarut etil asetat : n-heksan. Pemisahan fraksi etil asetat dengan kromatografi kolom menghasilkan tiga fraksi yaitu FEA-1 (1,9225 g), FEA-2 (0,2022 g) dan FEA-3 (0,1707 g) dan uji bioaktivitas ketiga fraksi tersebut dapat dilihat pada Tabel 2.

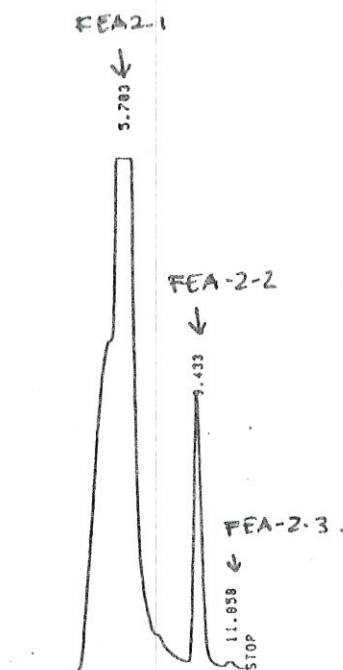
Tabel 2. Aktivitas inhibisi sel leukemia L_{1210} oleh FEA-1, FEA-2 dan FEA-3 bervariasi konsentrasi

Sampel	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibisi (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
FEA-1	5	40,00	> 5
	10	66,25	
FEA-2	5	85,00	< 5
	10	92,50	
	1	40,00	1,28
	2	75,64	
	3	80,77	
	4	94,87	
FEA-3	5	77,50	< 5
	10	88,75	

Tabel 2 menunjukkan bahwa fraksi etil asetat-2 (FEA-2) memberikan nilai inhibisi paling tinggi yaitu pada konsentrasi 1,28 $\mu\text{g/ml}$ dapat menghambat 50 % pertumbuhan sel leukemia L_{1210} . Menurut BUSCH dan LANE (6), aktivitas inhibisi sebanding dengan daya toksik senyawa terhadap sel . Senyawa tersebut bermuatan positif dan berfungsi

sebagai pusat aktif dalam reaksi alkilasi dengan pusat nukleofilik di dalam sel. Dalam reaksi alkilasi umumnya gugus -OH, -NH dan -OCH₃ adalah gugus aktif, dan diantara ketiga gugus tersebut, gugus metoksi adalah gugus yang paling aktif menyerang pusat nukleofilik.

Setelah diketahui bahwa FEA-2 mempunyai daya toksik yang lebih tinggi terhadap sel leukemia L₁₂₁₀, maka pemurnian fraksi ini dilanjutkan dengan KCKT yang menggunakan metanol sebagai pelarut. Kromatogram hasil pemisahan dengan KCKT dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Kromatogram KCKT FEA-2 dengan pelarut metanol, kecepatan alir 0,5 ml/menit pada panjang gelombang 280 nm.

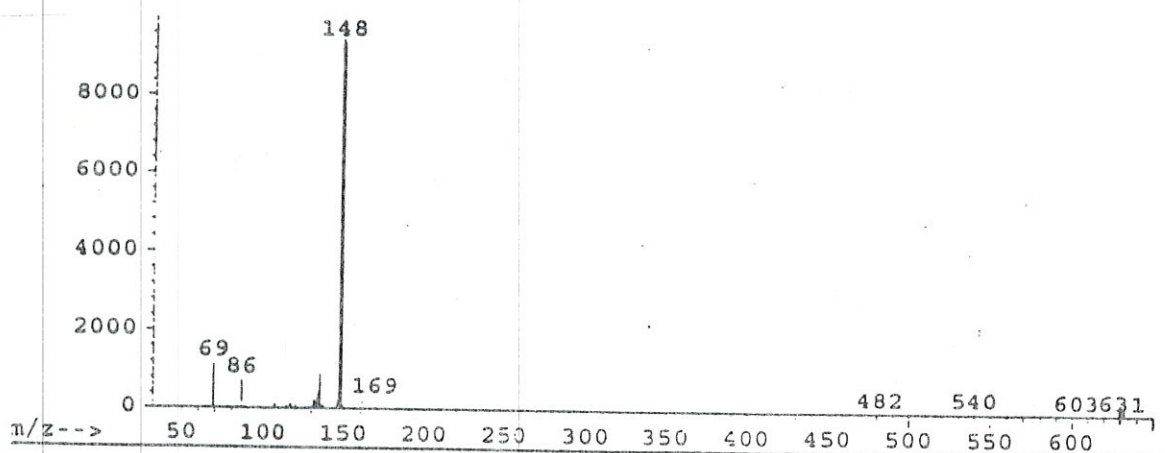
Hasil pemisahan ini dilanjutkan uji bioaktivitas terhadap sel leukemia L₁₂₁₀ (Tabel 3). Dari ketiga komponen hasil pemisahan KCKT terlihat bahwa persentase inhibisi senyawa isolat (FEA-2-2 seberat 22,12 mg) lebih tinggi (94,87%) pada konsentrasi 2 ug/ml dibandingkan dengan dua fraksi lainnya yaitu FEA-2-1 (41,15 mg) dan FEA-2-3

(10,23 mg) masing-masing pada konsentrasi 3 ug/ml hanya 65,38 dan 76,92 %. Data ini menunjukkan bahwa FEA-2-2 mengandung senyawa yang sangat toksik terhadap sel leukemia L₁₂₁₀ dengan IC₅₀ 0,06 ppm, dan dapat dikatakan bahwa gugus aktif pada senyawa FEA-2-2 (senyawa isolat) bekerja maksimal terhadap pusat nukleofilik. Senyawa isolat yang memiliki daya hambat tinggi ini ternyata adalah senyawa alkaloid, karena memberikan noda oranye dengan pereaksi Dragendroff, hal ini menunjukkan senyawa isolat mempunyai nitrogen pada salah satu cincin heterosiklik dan data ini mendukung kearah keaktifan gugus fungsi terhadap sel leukemia L₁₂₁₀.

Tabel 3. Aktivitas inhibisi sel leukemia L₁₂₁₀ oleh FEA-2-1, FEA-2-2 dan FEA-2-3

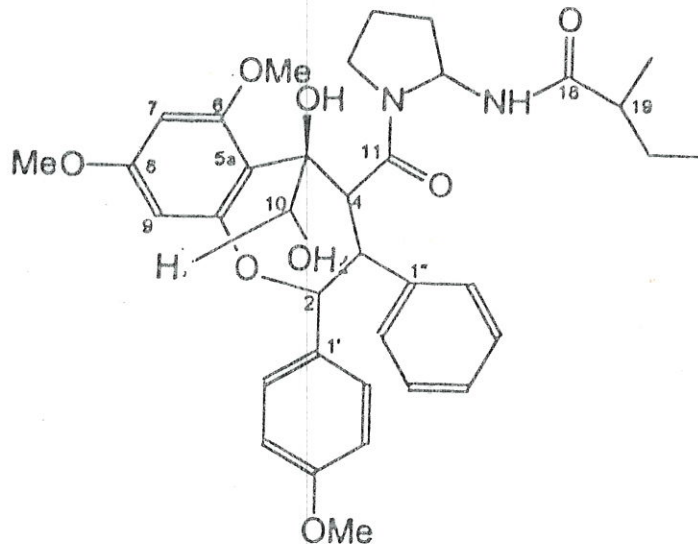
Sampel	Konsentrasi (ug/ml)	Inhibisi (%)	IC ₅₀ (ug/ml)
FEA-2-1	1	47,43	1,40
	3	65,38	
FEA-2-2	0,05	40,00	0,06
	0,1	79,48	
	0,3	86,00	
	0,6	94,87	
FEA-2-3	1	43,59	1,62
	3	76,92	

Penentuan molekul senyawa isolat dilakukan dengan penetapan kemungkinan rumus molekul dari intensitas puncak ion molekul pada spektrum massa (KG-MS). Puncak ion molekul senyawa isolat didapat pada m/z 631 dengan puncak dasar m/z 148 dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar. Spektrum massa senyawa isolat

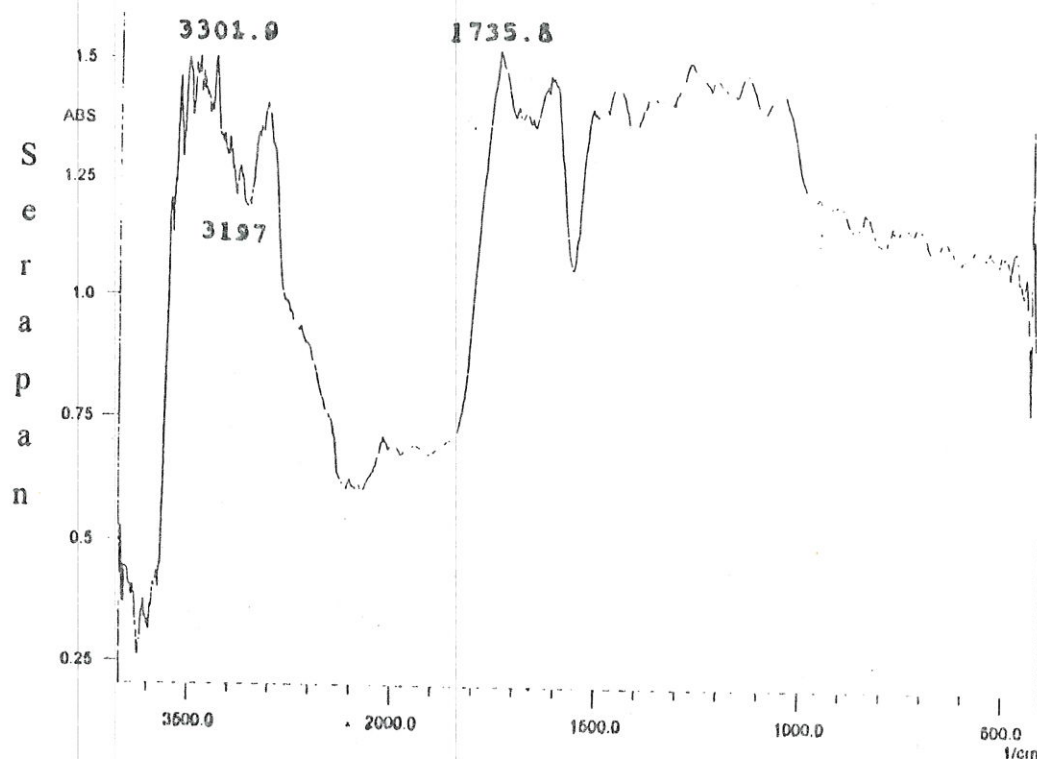
Hasil analisis spektrum senyawa isolat dengan rumus molekul $C_{36}H_{42}N_2O_8$ menurut DUMONTET et.al.(4) merupakan suatu senyawa turunan siklopentatetrahidrobenzofuran yang berikatan dengan suatu gugus 2-aminopirolidin yang dikenal sebagai aglain B, senyawa tersebut juga terdapat pada bagian daun *A. argentea* (Gambar 3).



Gambar 3. Struktur molekul senyawa aglain B

Pada Gambar 3 terlihat adanya gugus metoksi yang tersubstitusi pada cincin benzen. Adanya gugus metoksi makin memperjelas keaktifan senyawa isolat terhadap sel leukemia. Hal ini dapat dikaitkan dengan terbentuknya ikatan silang antara gugus aktif pada senyawa isolat terhadap pusat nukleofilik. Menurut BUSH dan LANE (6) serta SAXTON (7), akibat terbentuknya ikatan silang dapat menimbulkan beberapa kemungkinan yaitu terbentuknya ikatan silang pada salah satu fosfat rantai DNA sel dan mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim alkalin fosfatase; reaksi langsung dengan guanin pada rantai DNA dan terjadi perubahan DNA yang *irreversible*; reaksi langsung terhadap jaringan hemapoetik mengakibatkan destruksi limfosit dewasa dan terhambatnya proliferasi sehingga produksi kromosom menurun.

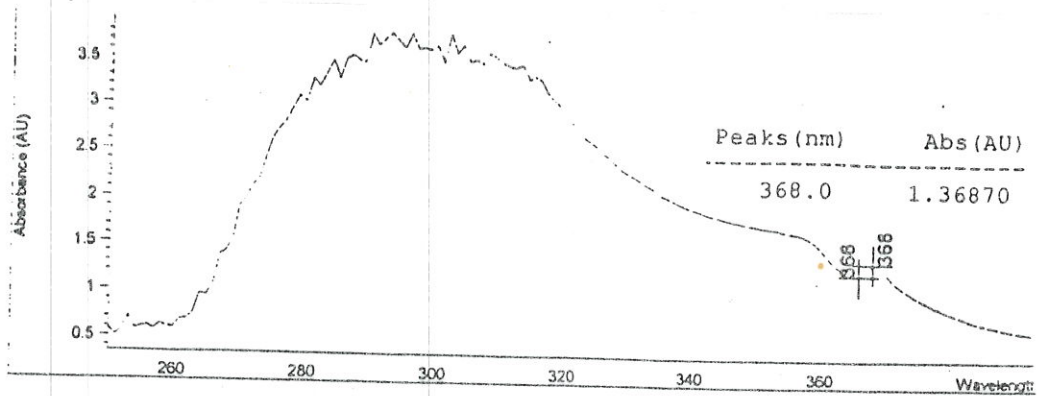
Senyawa alkaloid selalu mengandung nitrogen pada salah satu cincin aromatis dan gugus-gugus fungsi lain. Pada senyawa aglain B juga terlihat adanya gugus N-H, C=O yang dominan, data ini dapat dilihat pada spektrum infra merah pada Gambar 4.



Gambar 4. Spektrum infra merah senyawa aglain B

Adanya gugus fungsi OH dan NH pada umumnya muncul tumpang tindih pada daerah $3700 - 3000 \text{ cm}^{-1}$. Pada Gambar 4 pada frekuensi $3301,9 \text{ cm}^{-1}$ dapat dikatakan gugus NH karena vibrasi rentangan NH muncul pada kisaran 3500 hingga 3300 cm^{-1} . Pada senyawa isolat kemungkinan atom N terikat dalam lingkaran heteroaromatik, biasanya gugus NH pada heteroaromatik muncul pada daerah $3500 - 3220 \text{ cm}^{-1}$, pergeseran frekuensi ini tergantung dari ikatan hidrogen, makin kecil ikatan hidrogen maka pergeseran pita mengarah frekuensi lebih kecil. Gugus karbonil menyerap kuat pada daerah 1850 hingga 1650 cm^{-1} besarnya perubahan disebabkan oleh momen dipol. Serapan C=O terjadi pada frekuensi 1735 cm^{-1} , daerah penyerapan karbonil ini lebih rendah dari frekuensi karbonil normal karena adanya ikatan hidrogen antar molekul, dan dapat diperkirakan bahwa ikatan dapat terjadi dengan

gugus NH sebagai amida. Pada frekuensi $3197,8\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya serapan lemah dari gugus hidroksil dan adanya senyawa aromatik memberikan serapan rentangan cincin C=C muncul dalam bentuk sepasang serapan pada 1600 dan 1475 cm^{-1} .



Gambar 5. Spektrum UV-Vis senyawa aglain B

Data spektrum UV-Vis menunjukkan senyawa menyerap pada panjang gelombang 368 nm yang menandakan adanya benzen tersubstitusi dan makin panjangnya sistem terkonjugasi. Bila gugus penarik elektron seperti C=O dan gugus pemberi elektron OH dan OCH_3 yang satu terhadap lainnya ada pada posisi para, maka terjadilah pergeseran kearah panjang gelombang yang lebih besar. Demikian juga bila sistem terkonjugasi dalam molekul makin panjang berarti melibatkan lebih banyak atom yang berikatan pi dan terjadi pergeseran merah atau dikenal efek batokromik. Pada senyawa aglain B terlihat adanya sistem terkonjugasi tersubstitusi dengan berbagai gugus, sehingga terjadi pergeseran kearah panjang gelombang yang lebih panjang.

KESIMPULAN

Isolasi senyawa bioaktif dari kulit batang Simalur (*Aglaia argentea*) menghasilkan senyawa aktif terhadap sel leukemia L_{1210} . Senyawa aktif tersebut merupakan senyawa alkaloid yang memberikan noda oranye dengan pereaksi Dragendroff dan menunjukkan

adanya gugus fungsi amin, hidroksil dan karbonil dengan spektrofometer infra merah. Senyawa mempunyai bobot molekul 631 dan memberikan serapan pada panjang gelombang 368 nm dan dipostulasikan senyawa tersebut senyawa aglain B dan sangat aktif menghambat pertumbuhan sel leukemia L₁₂₁₀ yaitu pada IC₅₀ 0,06 ppm.

DAFTAR PUSTAKA

1. SOFYAN, W., Genetika, Penerbit Tarsito Bandung, (1980).
2. CORDEL, G.A., Recent experimental and clinical data concerning antitumor and cytotoxic agents from plants, Proceeding in life-science. Springer Verlag Berlin Heidelberg, New York (1977).
3. SUMATRA, M., Beberapa senyawa penghambat pertumbuhan sel leukemia L₁₂₁₀ dari *Physalis minima* L, disertasi ITB, Bandung (1996).
4. DUMONTET, V., THOISON, O., OMOBUWAJO, O.R., MARTIN, M.T., PERROMAT, G., CHIARONI, A., RICHIE, C., PAIS, M., and SEVENET, T., New nitrogenous and aromatic derivatives from *Aglaia argentea* and *A. forbesii*, *Phytochemistry*, 41, 20 (1996) 6931 - 6942.
5. OMOBUWAJO, O.R., MARTIN, T., PERROMAT, G., SEVENET, T., AWANG, K., and PAIS, M., Cytotoxic cycloartanes from *Aglaia argentea*, *Phytochemistry*, 41, 5 (1996) 1325 - 1328.
6. BUSCH, H.M.D., and LANE, M.M.S., *Chemotherapy*, Year Book Medical Publisher, Inc (1967) Chicago.
7. SAXTON, J.E., *The alkaloid Vol. I*, Berlington House, London (1971).