

Uji Aktivitas Antikanker Secara *In Vitro* dengan Sel Murine P-388 Senyawa Flavonoid dari Fraksi Etilasetat Akar Tumbuhan Tunjuk Langit (*Helminthostachis Zeylanica* (Linn) Hook)

FITRYA DAN LENNY ANWAR

Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Sriwijaya, Sumatera Selatan, Indonesia

INTISARI: Telah dilakukan isolasi dan uji aktivitas anti kanker secara invitro dengan sel murine P-388 senyawa flavonoid dari fraksi etilasetat akar tumbuhan tunjuk langit (*Helminthostachis zeylanica* (Linn) Hook). Isolasi senyawa flavonoid dilakukan dengan metoda ekstraksi dan fraksinasi. Uji kemurnian dilakukan dengan teknik KLT dan penentuan titik leleh. Uji aktivitas antikanker dilakukan dengan metode bioassay menggunakan sel murine P-388. Dari penelitian ini diperoleh Kristal FM dengan $R_f = 0,425$, titik leleh $241-242^\circ\text{C}$ dan menunjukkan warna kuning dengan pereaksi serum sulfat. Spektrum UV dalam pelarut metanol menunjukkan serapan maksimum pita I pada 347 nm dan serapan maksimum pita II pada 275 nm. Pergeseran pada pelarut MeOH+NaOH dan MeOH+AlCl₃/HCl mengindikasikan adanya substituen 4'-OH dan 5-OH. Pergeseran hipsokromik dalam pelarut MeOH+AlCl₃/HCl dan adanya puncak kedua dalam pita II pada 215 nm menunjukkan bahwa sistem orto-OH pada cincin B berada pada posisi 3', 4'.

KATA KUNCI: antikanker, invitro, flavonoid, hipsokromik

ABSTRACT: Flavonoid had been isolated from ethyl acetate fraction of tunjuk langit's root (*Helminthostachys zeylanica* (Linn) Hook). The extraction was done by maceration and fraxitination method. The result of isolation is yellow crystal with $241-242^\circ\text{C}$ in melting point. The UV spectrum in methanol solvent showed a maximum absorption at 347 nm in band I and 275 nm in band II. In MeOH+NaOH and MeOH+AlCl₃/HCl solvent taken place bathochromic shift indicated there were 4'-OH and 5-OH. In MeOH+AlCl₃/HCl to MeOH+AlCl₃ solvent happened a hipsochromic shift indicated there was orthodihydroxyl on ring B. There was second peak in band II at 215 nm showed that system of ortho-OH at ring B is in 3', 4'.

KEYWORDS: anticancer, invitro., flavonoid, hipsochromic

Januari 2009

1 PENDAHULUAN

Tunjuk langit (*helminthostachys zeylanica* (linn) hook) adalah tumbuhan paku-pakuan yang telah lama digunakan oleh masyarakat sebagai obat tradisional. Bagian akar dari tumbuhan ini digunakan sebagai obat batuk 100 hari, disentri, penyakit hidung atau tenggorokan dan permulaan penyakit paru-paru^[1]. Selain itu juga digunakan sebagai obat kuat dan impotensi, sedangkan batangnya untuk obat diare^[2]. Heyne^[1] melaporkan bahwa tunjuk langit juga digunakan sebagai obat pening, batuk rejan, disentri dan luka. Akar tunjuk langit secara tradisional telah digunakan oleh masyarakat Inderalaya sebagai salah satu bahan dari campuran obat penyakit kanker^[3]. Berdasarkan informasi yang diperoleh dari masyarakat di kabupaten Lahat, rebusan akar tunjuk langit dapat digunakan sebagai obat penambah darah, daunnya digunakan sebagai obat penghangat tubuh

dan bunganya digunakan sebagai obat pusing.

Napralert^[2] juga melaporkan aktivitas biologis dari tumbuhan tunjuk langit, di antaranya getah dari tumbuhan tunjuk langit memiliki aktivitas antivirus dan batangnya memiliki aktivitas antidiare tetapi bagian-bagian tumbuhan tunjuk langit dalam ekstrak etanol 95% dengan bakteri *Escherechia coli* dan *Staphylococcus aureus* tidak menunjukkan aktivitas antibakteri. Masyarakat di India menggunakan akar tunjuk langit sebagai obat kuat dan impotensi^[4], di Malaysia batang tunjuk langit digunakan sebagai obat diare, mengatasi pendarahan pada hidung dan akarnya digunakan untuk mengobati penyakit batuk rejan dengan cara memakan bagian akar yang telah ditumbuk halus bersama dengan buah pinang^[5]. Akar tunjuk langit juga telah digunakan oleh suku Kattunaikan, Kerala untuk mengobati berbagai penyakit pada hati^[6].

Tunjuk langit merupakan salah satu spesies dari *Ophioglossaceae* yang dikenal sebagai rawu bekubang

oleh masyarakat melayu. Tumbuhan ini merupakan tumbuhan tahunan yang berdasarkan uji fitokimia mengandung saponin, flavonoid dan fenolik. Hal ini dikuatkan oleh data-data yang dikeluarkan oleh BPOM yang menyatakan bahwa kandungan kimia dari tunjuk langit yaitu saponin, flavonoid dan polifenol^[7].

Penyakit kanker merupakan penyakit yang menjadi salah satu ancaman utama terhadap kesehatan karena merupakan penyebab kematian kedua setelah penyakit jantung. Di Indonesia dilaporkan kematian akibat kanker meningkat setiap tahunnya mulai 1,4% pada 1972 sampai 4,4% pada tahun 1992^[8]. Dalam mengatasi penyakit kanker ini berbagai upaya telah dilakukan di antaranya mencari senyawa antikanker dari tumbuh-tumbuhan.

Studi literatur menunjukkan bahwa tumbuhan Tunjuk Langit kaya akan metabolit sekunder yang berpotensi aktif secara biologis. Uji fitokimia menunjukkan tumbuhan tunjuk langit mengandung steroid, flavonoid saponin dan polifenol. Uji aktivitas sitotoksik dengan metoda *brine shrimp lethality test* (BSLT) fraksi etilasetat akar tumbuhan tunjuk langit menunjukkan nilai LC_{50} adalah 27 ppm^[9]. Diketahui ada korelasi yang positif antara aktivitas sitotoksik dan antioksidan dengan aktivitas antikanker^[10]. Berdasarkan hal tersebut, pada penelitian ini dilakukan isolasi senyawa flavonoid dan uji aktivitas antikanker senyawa flavonoid hasil isolasi secara *in-vitro* dengan sel murine P-388.

2 METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sriwijaya, sejak bulan Mei hingga bulan Oktober 2008. Pengukuran spektrum UV dilakukan di Jurusan Kimia Institut Teknologi Bandung dan uji aktivitas antikanker dilakukan di ITB.

2.2 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari berbagai alat gelas yang biasa digunakan di laboratorium, seperangkat alat destilasi, corong pisah, rotari evaporator R-114 Buchi dengan sistem vakum Buchi B-169, *chamber*, neraca analitis, kolom kromatografi gravitasi, kromatografi radial (kromatotron) model 7924T, seperangkat alat uji antikanker termasuk mikroplat *reader*, laminar *airflow*, inkubator CO_2 dan tabung dekar penyimpanan sel P-388.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah akar tumbuhan tunjuk langit (*H. zeylanica* (Linn) Hook), *n*-heksan teknis, metanol teknis, etil asetat teknis, dimetilsulfoksida, kloroform, plat KLT

silika gel G 60 F₂₅₄, silika gel G 60 (70-230 mesh), silika gel H 60 F₂₅₄ (230-400 mesh), serum sulfat 1,5% dalam H_2SO_4 2N, iodium dan uap amonia, sel P-388 yang disuplai dari *Japan Fondation for Cancer*.

2.3 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam dua tahap. Tahap pertama adalah rekoveri senyawa flavonoid dari fraksi etilasetat dan tahap kedua adalah uji aktivitas antikanker senyawa hasil isolasi.

Isolasi senyawa flavonoid Sampel akar tunjuk langit diambil dari perbukitan antara desa Jati dan desa Kuba, kecamatan Pulau Pinang, kabupaten Lahat, Sumatera Selatan. Sampel dibersihkan, dikeringanginkan pada temperatur kamar lalu digiling. Sampel yang sudah dikeringkan dan dihaluskan dimaserasi dengan *n*-heksana dan etilasetat berturut-turut. Masing-masing fraksi dipekatkan dengan peng-uap vakum putar. Fraksi etilasetat dilanjutkan dengan kromatografi kolom dan kromatotron menggunakan silika gel 60. Setiap fraksi dimonitor dengan plat KLT silika gel GF₂₅₄ dengan pereaksi penampak noda serum sulfat dan uap iodium.

Bioassay menggunakan sel murine leukemia P-388^[8] Sel kanker P-388 dibiakkan dalam medium RPMI-1640 yang diberi serum anak sapi sebanyak 5% dan kanamycin (100µg/ml). Sel (3 × 3 sel/sumur) dibiakkan dalam plat 96 sumur terdiri dari 100l medium pertumbuhan per sumur dan diinkubasi pada 37°C dalam humidifier 5% CO_2 . Beberapa variasi senyawa (10 µl) ditambahkan kedalam kultur pada hari pertama setelah transplantasi. Pada hari ketiga 20µl larutan MTT (5 mg/ml) per sumur ditambahkan ke setiap medium kultur. Setelah 4 jam inkubasi, larutan 100 ml SDS 10% -HCl 0,01 N ditambahkan ke setiap sumur dan kristal formazan disetiap sumur dilarutkan melalui pengadukan dengan pipet. Setelah itu larutan diukur optikal densitinya menggunakan mikroplat *reader* (Tohso MPR-A4i) atau ELISA *reader* pada panjang gelombang 550 dan 700 nm. Percobaan dilakukan dengan pengukuran triplo.

3 HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi senyawa flavonoid dari fraksi etil asetat akar tumbuhan tunjuk langit dilakukan dengan kromatografi kolom vakum dan kromatografi kolom gravitasi. Untuk memisahkan senyawa-senyawa yang terdapat dalam fraksi etil asetat, dilakukan kromatografi kolom vakum dan kromatografi kolom gravitasi. Uji kemurnian senyawa hasil isolasi dilakukan dengan teknik KLT dan uji titik leleh.

Spektrum UV senyawa hasil isolasi dalam pelarut metanol menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang 347 nm yang berasal dari cincin B yang berkonjugasi dengan gugus karbonil membentuk sistem sinamoil. Pada pita II serapan maksimum muncul pada panjang gelombang 275 nm yang berasal dari konjugasi sistem benzoil pada cincin A. Spektrum ini memperlihatkan ciri khas senyawa flavonoid kelompok flavon yang pita I memiliki serapan maksimum pada panjang gelombang 330-360 nm dan pita II pada panjang gelombang 250-280 nm^[11].

Penambahan pereaksi geser NaOH pada senyawa hasil isolasi menyebabkan terjadinya pergeseran batokromik sebesar 58 nm dengan peningkatan intensitas menunjukkan adanya 4'-OH dan senyawa flavonoid ini tidak tersubstitusi oleh 3-OH. Tidak adanya substituen 3-OH juga terlihat dari tidak terjadinya pergeseran sejauh 50-60 nm pada spektrum AlCl₃/HCl terhadap pelarut metanol. Hal ini mengindikasikan bahwa senyawa hasil isolasi merupakan senyawa flavonoid kelompok flavon.

Pada spektrum UV dengan pereaksi geser NaOH terlihat adanya pita baru yang memiliki serapan maksimum 341 nm, ini menunjukkan bahwa tidak terdapat substituen 7-OH. Penambahan pereaksi geser AlCl₃ mengakibatkan terjadinya pergeseran batokromik sejauh 71 nm, ini menunjukkan terbentuknya kompleks tahan asam antara gugus hidroksi dan keton yang bertetangga dan kompleks tak tahan asam dengan gugus orto-dihidroksi. Pergeseran hipsokromik spektrum UV dengan pereaksi geser AlCl₃/HCl terhadap AlCl₃ sejauh 50 nm yang menunjukkan bahwa kompleks tidak tahan asam yang terbentuk dari orto-diOH dengan AlCl₃ telah terurai kembali, hal ini mengindikasikan bahwa terdapat substituen orto-diOH pada cincin B. Adanya puncak kedua dalam pita II yang muncul pada panjang gelombang 215 nm mengindikasikan bahwa posisi orto pada cincin B berada pada posisi 3' dan 4'^[11].

Berdasarkan pergeseran spektrum UV senyawa hasil isolasi terhadap penambahan pereaksi geser NaOH, AlCl₃ dan AlCl₃/HCl, maka dapat diduga bahwa senyawa ini merupakan senyawa flavon yang terdapat gugus 5-OH dengan oksigenasi pada atom C₆ dan 3', 4'-OH pada cincin B.

Uji aktivitas antikanker terhadap sel murine leukemia P388 senyawa flavonoid hasil isolasi menunjukkan aktivitas yang mencolok dengan nilai IC 50 2,4 µg/ml. Nilai ini menunjukkan bahwa senyawa flavonoid sangat aktif sebagai antikanker. Menurut Cho dkk.^[12] kuatnya aktivitas antikanker dinyatakan sebagai berikut:

1. IC 50 5 µg/ml = sangat aktif;
2. IC 50 5-10 µg/ml = aktif;
3. IC 50 11-30 µg/ml = sedang; dan

4. IC 50 >30 µg/ml = tidak aktif.

Gugus OH yang terikat pada cincin aromatik merupakan faktor yang penting dalam aktivitas sitotoksik suatu senyawa^[13].

4 SIMPULAN DAN SARAN

4.1 Simpulan

1. Hasil analisis terhadap spektrum UV menunjukkan senyawa flavonoid hasil isolasi dari fraksi etilasetat termasuk kelompok flavon dengan sistem orto-OH pada cincin B berada pada posisi 3', 4'.
2. Hasil uji antikanker dengan bioassay terhadap sel murine P388 menunjukkan IC 50 2,4 µg/ml artinya senyawa flavonoid sangat aktif sebagai antikanker.

4.2 Saran

Disarankan untuk melanjutkan elusidasi struktur dengan NMR untuk lebih memastikan struktur senyawa hasil isolasi dan menentukan struktur senyawa flavonoid lain dari akar tumbuhan tunjuk langit.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Heyne, K., 1987, *Tumbuhan Berguna Indonesia*, Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan, Yayasan Sarana Wana Jaya, Bogor
- [2] Napralert, 2003, *Informasi Tumbuhan Helminthostachys zeylanica Hook*, Fakultas Farmasi, Universitas Andalas Padang
- [3] Kurniawati, M., 2003, *Isolasi Steroid dari Fraksi Aktif Sitotoksik Akar Tunjuk Langit (Helminthostachys zeylanica (Linn) Hook)*, Kimia FMIPA UNSRI, Sumatera Selatan
- [4] Singh, V.K., Z.A. Ali, S.T.H. Zaidi, dan M.K. Siddiqui, 1996, *Fitoterapia*, Departement Botany Aligarh Muslim Universitas Aligarh, India
- [5] Jalil, J., A.A. Bdin, dan T.S. Chye, 1986, *Phytochemical Study of Ophioglossaceae Family Species, Proc Malays Biochemistry Society Conference*, Fakultas Sains Hayati Universitas Kebangsaan Malaysia, Bangi, Malaysia
- [6] Suja, S.R., P.G. Latha, Pushpanga, dan S. Rajasekharan, 2003, *Evaluation of Hepatoprotective Effects of Helminthostachys zeylanica (L.) Hook Against Carbon Tetrachloride-induced Liver Damage in Wistar Rats*, www.answers.com/topic/helminthostachys-1, Diakses pada 14 Desember 2006
- [7] Anonim, 2005, *Helminthostachys zeylanica Hook*, www.pom.go.id-helminthostachyszeylanicahook/manoon-MicrosoftInternetExplorer, Diakses pada 04 Desember 2006
- [8] Atta-ur-Rahman, M.I. Choudhary, dan W.J. Thomsen, 2001, *Bioassay Techniques For Drug Development*, Harwood Academic Publisher, San Diego, USA
- [9] Fitriya, L. Anwar, 2006, *Isolasi Senyawa Aktif Sitotoksik dari Fraksi Etilasetat Akar Tumbuhan Tunjuk Langit (Helminthostachys zeylanica Linn)*, *Laporan Penelitian DIPA UNSRI*

- [10] Anwar, L., 2004, Peran Flavonoid sebagai Antioksidan Alami Terhadap Peningkatan Kesehatan, *Buletin Kimia FMIPA UNSRI*, Penerbit Jurusan Kimia UNSRI, Sumatera Selatan
- [11] Markham, K.R., 1988, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, Penerbit ITB, Bandung
- [12] Cho, S.J, H.L. Valerie, S.H. Wu-Sing, K.Y. Sing, J.P. Pereira, dan S.H. Goh, 1998, Novel Cytotoxic Polyphenylated Xanthones From *Garcinia gaundichaudii* (Guttiferae), *Tetrahedron*, 54 (10915-10924)
- [13] Ito, C., M. Itogawa, T. Takakura, N. Ruang-rungsi, F. Enjo, H. Tokuda, H. Nishino, dan H. Hurakawa, 2003, Chemical Constituents of *Garcinia fusca*, *Structure Elucidation of Eight New Xanthones Their Cancer Chemopreventive Activity Journal Natural Product*, 66:200-2005