

**SENYAWA FLAVONOID DARI EKSTRAK ETIL ASETAT KULIT BATANG
TUMBUHAN *Bauhinia hullettii* Prain DAN UJI *IN VITRO* SEL MURINE
LEUKEMIA P-388**

**Feri Ari Bangun Siahaan¹, Johni Azmi², Lenny Anwar³
feriaribangun@gmail.com**

**Program Studi Pendidikan Kimia
Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan
Universitas Riau**

ABSTRAK

Isolation, characterization, and in vitro testing against murine leukemia P-388 cell of flavonoid compounds from Bauhinia hullettii Prain stem bark have been performed. Isolation was carried out by extraction and fractionation. Extraction used maceration method at room temperature to obtain n-Heksana extract, dicloromethane extract, and etil acetate extract. Based on phytochemical testing, etil acetate extract contain flavonoid compounds. Extraxct etil acetate was fractionated by vacum column chromatography, gravitation column chromatography, and flash column chromatography. The fractionation resulted yellow crystal that having melting point of 188°C - 189°C. The in vitro testing against murine leukimia P-388 cell of isolated flavonoid compounds show "medium" activity with $IC_{50} = 22,5 \mu\text{g/ml}$.

Key word : Bauhinia hullettii Prain, Flavonoid, Murine Leukemia P-388 Cell

PENDAHULUAN

Biodiversitas Indonesia yang tinggi menyimpan banyak sekali potensi yang perlu dieksplorasi, khususnya potensi tumbuh-tumbuhan dalam bidang farmakologis dan kesehatan. Keragaman jenis tumbuh-tumbuhan menyebabkan ditemukannya beranekaragam senyawa-senyawa bahan alam yang memiliki bioaktivitas tertentu.

Bauhinia merupakan salah satu genus utama dari famili Leguminosae, famili tumbuhan berbunga terbesar di daerah tropika asia setelah famili Composite dan Orchidaceae (Harborne, 1971). Genus *bauhinia* telah diketahui mengandung senyawa-senyawa yang aktif sebagai antikanker. Kumar dkk. (2004) melaporkan adanya aktivitas antitumor dan antioksidan dari kulit batang *Bauhinia racemosa*.

Flavonoid merupakan salah satu golongan senyawa metabolit sekunder yang berguna dalam bidang farmakologi karena potensi bioaktivitasnya. Golongan

senyawa flavonoid memiliki potensi bioaktivitas sebagai antikanker. Beberapa senyawa flavonoid telah dilaporkan memiliki aktifitas antikanker yang tinggi diantaranya Artonin E (*Artocarpus comunis*) dan kuesertin. Gancaunin Q, paratocarpin L, kanzonol C, 6-prenil apigenin, dan Garsinisidon A memiliki aktifitas antikanker yang tinggi terhadap sel kanker murine P-388 (Lenny, 2006).

Kemampuan flavonoid sebagai antikanker dihubungkan dengan keberadaan gugus hidroksi yang tersubstitusi pada flavonoid, adanya rantai samping gugus prenil, dan adanya resonansi (Ito, *et al.*, 2003). Ahmad (2000) menyatakan bahwa sebagian besar senyawa flavonoid terprenilasi dapat menghambat pertumbuhan sel murine leukemia P-388. Tumbuhan dari genus *Bauhinia* diketahui kaya akan senyawa flavonoid yang tersubstitusi gugus isoprenil, seperti yang telah diisolasi dari *Bauhinia purpurea* yaitu senyawa jenis monoprenilflavon (siklocampedol, artocarpin) dan diprenilflavon (heteroflavanon A) (Achmad, 1998).

Bauhinia hulletti Prain merupakan salah satu spesies dari genus *Bauhinia* yang banyak ditemukan di hutan Sumatra. Ekstrak aseton kulit batang tumbuhan *Bauhinia hulletti* Prain menunjukkan hasil positif terhadap flavonoid berdasarkan uji noda plat KLT (Lenny, dkk, 2008). Lenny, dkk (2010) telah mengisolasi senyawa flavonoid dari fraksi aseton kulit batang *Bauhinia hulletti* Prain yaitu 5,7-dihidroksi,4'-metoksi,6-metil flavanon dan senyawa flavonoid ini menunjukkan aktifitas antikanker yang sangat kuat (IC_{50} 7,8 μ M) terhadap sel kanker murine leukemia P-388. Berdasarkan hal tersebut, maka perlu dilakukan isolasi senyawa flavonoid dari ekstrak etil asetat kulit batang tumbuhan *Bauhinia hullettii* Prain dan mengetahui aktivitas sitotoksiknya terhadap sel murine leukemia P-388.

METODOLOGI PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan antara bulan Maret hingga Juni 2013 di Laboratorium PMIPA Kimia Universitas Riau. Uji aktivitas sitotoksik terhadap sel murine leukemia P-388 dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam Institut Teknologi Bandung.

Prosedur Penelitian

Persiapan Sampel

Sampel kulit batang *Bauhinia hulletti* Prain diperoleh dari hutan lindung PTBA Tanjung Enim Palembang. Sampel dikering-angikan selama 1 minggu, kemudian ditumbuk sampai halus.

Ekstraksi dengan Maserasi Kulit Batang *Bauhinia hulletti* Prain

Sebanyak 3 Kg sampel halus kulit batang *Bauhinia hulletti* Prain diekstraksi dengan cara maserasi (perendaman) menggunakan pelarut n-heksana selama dua hari. Maserasi dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan menggunakan sampel yang sama. Kemudian dilakukan penyaringan sehingga diperoleh ampas dan filtrat. Filtrat yang

diperoleh dipisahkan dengan menggunakan rotari evaporator sehingga diperoleh ekstrak pekat n-heksana. Kemudian dengan cara yang sama ekstraksi dilanjutkan dengan pelarut yang lebih polar metilen klorida, dan etil asetat. Pada akhir ekstraksi akan diperoleh ekstrak pekat n-heksana, metilen klorida, dan etil asetat. Semua ekstrak kemudian di uji fitokimia dengan pereaksi Mg/HCl sehingga diperoleh gambaran ekstrak mana yang berpotensi mengandung flavonoid. Ekstrak etil asetat menunjukkan (+) flavonoid sehingga dipisahkan lebih lanjut.

Pemisahan dan Pemurnian (Fraksinasi) Ekstrak Etil Asetat

Ekstrak etil asetat dari kulit batang *Bauhinia hulletti* Prain yang mengandung senyawa flavonoid dipisahkan lebih lanjut dengan menggunakan kromatografi vakum cair (KVC). Pemisahan dilakukan dengan menggunakan eluen n-heksana dan etil asetat yang ditingkatkan kepolarannya. Hasil KVC kemudian di KLT dan fraksi yang memperlihatkan pola noda yang sama digabung menjadi satu, sehingga diperoleh fraksi-fraksi utama. Fraksi yang mengandung flavonoid dipisahkan lebih lanjut menggunakan kromatografi kolom gravitasi, dan kromatografi flash sampai diperoleh senyawa flavonoid yang murni.

Uji Kemurnian Senyawa Hasil Isolasi

Senyawa flavonoid yang berhasil diisolasi kemudian di uji kemurniannya dengan uji KLT dengan 3 sistem eluen dan uji titik leleh. Senyawa yang memperlihatkan satu noda dengan berbagai variasi campuran eluen dan memperlihatkan range titik leleh yang sempit ($< 2^{\circ}\text{C}$) dianggap telah murni.

Uji Fitokimia Senyawa Hasil Isolasi

Uji fitokimia menggunakan pereaksi spesifik flavonoid Mg+HCl untuk mengetahui golongan senyawa flavonoid

Uji Aktivitas Sitotoksik Hasil Isolasi dengan Menggunakan Sel Kanker Murine Leukemia P-388

Kultur sel kanker murine leukemia P388 sejumlah 3×10^3 sel/mL disuspensikan ke dalam media RPMI 1640 yang telah mengandung FBS (*Fetal Bovine Serum*), penisilin dan streptomisin. Sel pada hari pertama diinokulasikan ke dalam *microplate* 96 well plate dan diinkubasi dalam inkubator CO_2 . Hari kedua dilakukan penambahan sampel yang dilarutkan dalam pelarut DMSO (dimetil sulfoksida). Sampel dengan konsentrasi beragam diencerkan dengan penambahan PBS (*phosphoric buffer solution*) dengan pH (7,30–7,65) ditambahkan ke dalam sel dalam *microplate* lalu dikocok dan disimpan kembali dalam inkubator CO_2 . Kontrol negatif terhadap aktivitas antikanker digunakan pelarut DMSO sedangkan kontrol positif digunakan senyawa standar *cis*-platin. Setelah 48 jam, ke dalam sel ditambahkan reagen MTT dan diinkubasi selama 4 jam untuk selanjutnya ditambahkan SDS dan dikocok dengan baik. Inkubasi sel dilanjutkan kembali selama 24 jam. Perubahan warna dari MTT kuning menjadi formazan ungu di dalam mitokondria sel yang masih hidup dapat dikuantifikasi pada panjang gelombang $\lambda=550$ nm dengan spektrofotometer. Nilai IC_{50} dilihat dari grafik hubungan antara konsentrasi senyawa bahan uji ($\mu\text{g}/\text{mL}$) dengan intensitas larutan dari viabilitas sel (Husniati, 2008).

HASIL DAN PEMBAHASAN

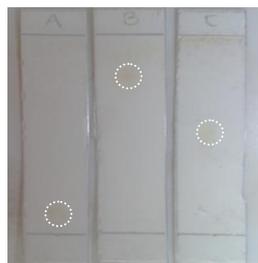
Kulit batang tumbuhan *Bauhinia hulletti* dikering-anginkan selama 1 minggu dan dihaluskan dengan lumpang. Pengeringan sampel dilakukan pada tempat yang tidak terkena cahaya matahari secara langsung. Hal ini dilakukan untuk mencegah rusaknya senyawa-senyawa yang rentan terhadap radiasi matahari. Penghalusan sampel dilakukan sampai berbentuk serbuk. Penghalusan sampel bertujuan untuk meningkatkan efektivitas ekstraksi.

Sebanyak 3 Kg serbuk halus kulit batang tumbuhan *Bauhinia hulletti* Prain diekstaraksi dengan metode maserasi (perendaman). Maserasi sampel menggunakan pelarut n-heksana, diklorometana, dan etil asetat. Maserasi dilakukan secara gradual dari pelarut yang paling nonpolar dan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Maserasi menghasilkan ekstrak n-heksana (30,739 g), ekstrak diklorometana (24,065 g), dan ekstrak etil asetat (27,385 g).

Ekstrak etil asetat (27,385 g) dipilih untuk pemisahan dan pemurnian lebih lanjut karena menunjukkan (+) flavonoid. Fraksinasi (Pemisahan dan pemurnian) dilakukan dengan kromatografi vakum cair menggunakan eluen n-heksana dan etil asetat yang ditingkatkan kepolarannya. Berdasarkan pola KLT, fraksi-fraksi hasil kromatografi vakum cair dikelompokkan menjadi 7 fraksi yaitu fraksi A – G.

Fraksi D (1,6 g) menunjukkan adanya noda kuning setelah disemprot dengan penampak noda serium (IV) sulfat yang mengindikasikan adanya flavonoid. Pemisahan lebih lanjut pada fraksi D dilakukan dengan kromatografi kolom gravitasi dan kromatografi kolom flash. Pemisahan dan pemurnian menghasilkan kristal berwarna kuning sebanyak 4,8 g.

Uji kemurnian senyawa hasil isolasi dilakukan dengan uji titik leleh, elusidasi dengan tiga sistem eluen yang berbeda, yaitu n-heksana-diklorometana-etil asetat (7:2:1), n-heksana-etil asetat (8:2), dan diklorometana-etil asetat (9,5:0,5). Ketiga elusidasi menghasilkan noda KLT yang selalu tunggal (gambar 1), hal ini mengindikasikan senyawa hasil isolasi telah murni.



Ket:

A = n-heksana-diklorometana-etil asetat (7:2:1)

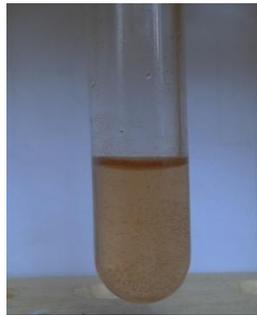
B = n-heksana-etil asetat (8:2)

C = diklorometana-etil asetat (9,5:0,5)

Gambar 1. Kromatogram Senyawa Hasil Isolasi

Kemurnian senyawa hasil isolasi juga diperkuat dengan uji titik leleh kristal dengan alat Fischer John. Kristal hasil isolasi memiliki titik leleh 188 °C -189 °C. Titik leleh ini berada pada range kurang dari 200°C yang menunjukkan bahwa kristal telah murni.

Uji fitokimia dengan menggunakan pereaksi spesifik Mg/HCl dilakukan untuk menentukan golongan senyawa flavonoid hasil isolasi. Hasil uji fitokimia senyawa hasil isolasi dengan pereaksi Mg/HCl memberikan warna (gambar 2) kuning yang mengindikasikan senyawa hasil isolasi tergolong senyawa flavon/isoflavon (Markham, 1988).



Gambar 2. Uji Fitokimia Senyawa Hasil Isolasi dengan Pereaksi Mg/HCl

Aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker murine leukimia P-388 dari senyawa hasil isolasi ditetapkan berdasarkan pada nilai IC_{50} . Menurut Ito et al, (2003) senyawa murni dikategorikan bersifat sitotoksik memiliki empat tingkatan yaitu (1) sangat aktif bila $IC_{50} < 5 \mu\text{g/mL}$, (2) aktif dengan nilai $IC_{50} 5-10 \mu\text{g/mL}$, (3) sedang dengan nilai $IC_{50} 11-30 \mu\text{g/mL}$ dan (4) kurang aktif dengan nilai $IC_{50} > 30 \mu\text{g/mL}$. Senyawa hasil isolasi memiliki nilai $IC_{50} = 22,5 \mu\text{g/mL}$, sehingga senyawa hasil isolasi termasuk senyawa yang bersifat sitotoksik terhadap sel kanker murine leukimia P-388 dengan keaktifan sedang.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan terhadap ekstrak etil asetat dari kulit batang *Bauhinia hullettii* Prain, maka dapat disimpulkan :

1. Senyawa flavonoid hasil isolasi sebanyak 4,5 mg berupa kristal berwarna kuning dengan titik leleh $188^{\circ}\text{C} - 189^{\circ}\text{C}$.
2. Uji sitotoksik senyawa hasil isolasi dengan sel kanker murine P-388 menunjukkan aktifitas kategori sedang dengan $IC_{50} 22,5 \mu\text{g/mL}$.

Saran

Setelah melakukan penelitian ini, peneliti menyarankan:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai karakterisasi struktur senyawa hasil isolasi dengan spektroskopi IR, H-NMR, C-NMR, dan GC-MS untuk memperoleh struktur senyawa yang lengkap.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai hubungan struktur yang dimiliki senyawa flavonoid dengan aktifitas sitotoksiknya terhadap sel kanker murine P-388.

DAFTAR PUSTAKA

- A., Lenny dan Fitrya. 2006. Uji Aktivitas Antikanker Secara In Vitro dengan Sel Murine P-388 Senyawa Flavonoid dari Etilasetat Akar Tumbuhan Tunjuk Langit (*Helmynthostachi zeylanica* (Linn) Hook). *Jurnal Penelitian Sains Volume 12 Nomor 1(C) 12106. Universitas Sriwijaya : Sumatra Selatan.*
- A., Lenny, Eliza dan Julinar. 2008. *Eksplorasi Kandungan Kimia Antioksidan Tumbuhan Bauhinia hullettii Prain dari Kawasan Hutan Lindung PTBA Tanjung Enim Sumatera Selatan.* Laporan Penelitian Dosen Muda, Universitas Sriwijaya: Palembang.
- A., Lenny, Julinar dan Fitrya. 2010. *Senyawa Flavanon Dari Kulit Batang Bauhinia Hullettii Prain Dan Uji In Vitro Sel Kanker Murine P388*, Seminar dan Rapat Tahunan BKS PTN MIPA Wilayah Barat ke-23. Pekanbaru. 10-11 Mei 2010.
- Harborne, J. B. 1971. *Metode Fitokimia Penentuan Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*, Terjemahan Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. ITB Press: Bandung.
- Ito, C., M. Itoigawa, T. Takakura, N. Ruang Rungsi, F. Enjo, H. Tokuda, H. Nishino and H. Furukawa. 2003. Chemical Constituents of *Garcinia fusca*: Structure Elucidation of Eight New Xanthenes and Their Cancer Chemopreventive Activity. *The Journal of Natural Products*. 66: 200-205.
- Markham, K. R. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Terjemahan Kosasih Padmawinata, ITB Press: Bandung.