

IDENTIFIKASI SENYAWA HASIL ISOLASI AKAR PASAK BUMI (*Eurycoma longifolia* Jack) SECARA SPEKTROFOTOMETRI DAN UJI SITOTOKSISITAS TERHADAP SEL HELA

Nina Salamah, Any Guntarti
Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan
Jl. Prof. Dr. Soepomo, Janturan, Warung Boto, Yogyakarta
E-mail : syifaniputri@yahoo.com

PENGESAHAN
Telah diperiksa kebenarannya dan sesuai dengan ketentuan
Yogyakarta tgl. _____
FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AHMAD DAHLAN
DEKAN

Dr. Dyah Aryani Perwitasari, Apt., Ph.D
NIY. 60010301

ABSTRACT

Eurycoma longifolia Jack is one of Indonesian native plants that have anti-cancer potential. Isolated compounds methanol extract of the roots of Pasak Bumi in a preliminary study proved to be active as an anti-angiogenesis, so that further research needs to be done to prove the potential cytotoxicity the cellline in vitro an attempt to find new drugs for both cancer chemo preventive or chemotherapy. Approach also needs to be done to the structure of the isolated compounds roots of pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) to ensure that the types of compounds as anti-cancer potential. The roots of pasak bumi powder macerated with methanol and then fractionated using Vacuum Liquid Chromatography (VLC). Fraction to 2 which fluoresces blue under UV254 nm is purified using preparative TLC, the resulting isolates the test compound. In vitro cytotoxicity assay with HeLa cells made to isolate the test compound and using the positive control doxorubicin. Identification by UV and IR spectroscopy showed that the isolates isolated compounds have pasak bumi roots chromophore group and functional group C=O, -OH, -CH₂-, -CH₃, C=N and is able to inhibit the growth of HeLa cells but low potential.

Keyword : the roots of pasak bumi, the cytotoxic test, HeLa cells

PENDAHULUAN

Sasaran hasil riset nasional tahun 2025 di bidang obat bahan alam adalah terproduksinya hasil eksplorasi sumber daya alam Indonesia oleh industri lokal. Hal itu memerlukan banyak studi eksplorasi obat bahan alam Indonesia. Pasak bumi (*Eurycoma longifolia*, Jack) merupakan tanaman obat asli Indonesia yang secara tradisional biasa digunakan masyarakat untuk memperbaiki kemampuan seks pria dan mengobati demam. Hasil penelitian menunjukkan potensi beberapa kandungan akar pasak bumi sebagai anti malaria, anti kanker, dan afrodisiak (Ang, et al., 2004).

Kanker merupakan salah satu penyakit tidak menular yang sejak lama telah menjadi bagian dari permasalahan kesehatan masyarakat di seluruh dunia. Kanker juga merupakan penyebab kematian terbesar di seluruh dunia. Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) memperkirakan 7,6 juta orang meninggal akibat kanker pada tahun 2005 dan 84 juta orang akan meninggal hingga 10 tahun ke depan jika tidak ada upaya penanggulangannya. Penyakit kanker masih merupakan penyakit yang menakutkan karena sampai sekarang ini belum juga ditemukan terapi baku yang efektif. Cara pengobatan konvensional

dilakukan dengan pembedahan, penyinaran dan penggunaan obat sitostatik belum menghasilkan penyembuhan yang maksimal kecuali apabila dilakukan pada tahap dini (Anonim, 2006).

Pemanfaatan obat alam sebagai salah satu alternatif obat kanker sedang banyak dieksplorasi. Pasak bumi (*Eurycoma longifolia*, Jack) merupakan salah satu tanaman asli Indonesia yang memiliki potensi anti kanker (Sengupta *et al.*, 2004). Ekstrak metanol, butanol, kloroform, dan air dari akar pasak bumi terbukti memiliki efek sitotoksik terhadap sel KB, DU-145, RD, MCF-7, CaOV-3, dan MDBK (Nurhanan *et al.*, 2005). Penelitian lain menunjukkan beberapa kandungan aktif yang terdapat dalam ekstrak metanol akar pasak bumi memiliki efek sitotoksik terhadap sel A-549 dan MCF-7 (Kuo *et al.*, 2004). Beberapa obat alam dari China telah terbukti memiliki efek anti kanker melalui mekanisme : induksi apoptosis dan diferensiasi, peningkatan sistem imun, dan penghambat angiogenesis (Sengupta *et al.*, 2004).

Senyawa hasil isolasi ekstrak metanol akar pasak bumi dalam penelitian pendahuluan terbukti aktif sebagai anti angiogenesis (Salamah, 2008). Mendasarkan pada informasi di atas perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk membuktikan potensi sitotoksiknya terhadap *cell line* secara *in vitro* sebagai upaya untuk menemukan obat baru untuk kanker baik yang bersifat kemopreventif maupun kemoterapi. Pendekatan struktur juga perlu dilakukan terhadap senyawa hasil isolasi akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) untuk memastikan jenis senyawa yang berpotensi sebagai anti kanker.

METODE PENELITIAN

A. ALAT PENELITIAN

Alat-alat yang digunakan untuk isolasi meliputi: mesin penyerbuk, alat-alat gelas, *rotavapor*, panci maserasi, corong Buchner, timbangan analitik, bejana kromatografi, pipa kapiler, lampu UV 254 nm, oven, lempeng kaca ukuran 20x20 cm dan alat untuk membuat KLT dari lempeng kaca.

Microplate 96 well (*Nunclone*), sentrifuge Sigma 3K12 (*B. Braun Biotech International*), *blue tip* dan *yellow tip*, CO₂ Jacketed Incubator (Nuair TM IR autoflow), ELISA reader, haemocytometer (New Bauer), tabung conical steril (*nunclone*), *scarper*, tissue culture flask (*nunclone*), *Laminar airflow* (*Nuair*).

B. BAHAN PENELITIAN

Bahan utama dalam penelitian ini adalah akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) yang diperoleh dari Hutan Taman Pendidikan Fakultas kehutanan Universitas Iain Mangkurat, Banjarbaru, Kalimantan Selatan.

Bahan yang digunakan untuk isolasi adalah Metanol pa, Kloroform pa, aquadest dan silika gel GF 254 (*E. Merck*).

Bahan uji sitotoksitas adalah *Cell line* (Pemberian Prof. Tatsuo Takeya dari NAIIST, Japan, dan dikembangkan di LPPT-UGM). MTT {3,4,5-dimethylthiazol-2-yl}-2,5-diphenyltetrazolium bromide} (Sigma), *fetal bovine serum* (FBS) (Sigma), medium *Roswell Park Memorial* (RPMI) 1640 (Sigma), Fungison, Streptomisin (Sigma), Penisilin (Gibco BRL), (Sigma), SDS, DMSO.

C. JALANNYA PENELITIAN

1. Isolasi Serbuk Akar Pasak Bumi

Serbuk akar pasak bumi diekstraksi pelarut metanol secara maserasi kemudian sari metanol yang diperoleh, dievaporasi hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak metanol kemudian difraksinasi menggunakan VLC (*Vacuum Liquid Chromatography*) dengan fase diam silika gel dan dielusi menggunakan fase gerak kloroform-metanol-air dengan tingkat kepolaran yang semakin besar. Selanjutnya fraksi kedua yang cuma mengandung 2 isolat dipurifikasi menggunakan KLT Preparatif dengan fase diam silika gel GF254 dan fase gerak CHCl₃ : MeOH : H₂O = 6,5 : 2,5 : 0,4 kemudian dideteksi dengan lampu UV 254 nm. Pita yang berfluoresensi biru selanjutnya dimurnikan, karena pada penelitian sebelumnya isolat tersebut terbukti berpotensi antiangiogenesis (salah satu sifat senyawa anti kanker) sehingga sangat perlu diketahui apakah isolat tersebut juga poten dalam menghambat pertumbuhan sel kanker.

2. Uji Kemurnian Senyawa Hasil Isolasi Akar Pasak Bumi

Senyawa hasil isolasi akar pasak bumi bila di KLT dengan menggunakan fase diam silika gel GF 254 dan fase gerak kloroform : MeOH : aquadest = 6,5 : 2,5 : 0,4 memberikan hasil elusi berupa satu spot dengan Rf = 0,54.

3. Identifikasi struktur secara spektrofotometri UV dan IR

Pemeriksaan senyawa hasil isolasi dengan menggunakan alat Spektrofotometer UV dan IR kemudian Spektra yang dihasilkan diinterpretasi.

4. Uji Sitotoksik pada sel Hela

a. Pembuatan Larutan uji :

Isolat Senyawa hasil isolasi akar pasak bumi dibuat seri konsentrasi: 250 ; 125 ; 62.5 ; 31.25 ; 15.625 ; 7.81 ; 3.9 ; 1.95 g/ml dengan lebih dahulu difilter dengan mikrofilter 0, 2 m. Doksorubisin dibuat dengan dosis 50 ; 20 ; 10 ; 5 ; 1 dari 0, 5 g/ml.

b. Kultur sel kanker :

Sel Hela ditumbuhkan dalam kultur flask Media RPMI-1640 dengan 10% FBS. Setelah konfluen 60-70% media diganti dan satu hari berikutnya dipanen, dikulturkan dalam tube steril, dan disentrifugasi 1200 rpm/5menit. Supernatan dibuang, pelet diresuspensi dengan media penumbuh 2 ml, dihitung kerapatan sel mencapai $1,8 \times 10^4$ sel/100 l.

c. Uji sitotoksik :

Uji sitotoksik dilakukan menggunakan *plate* kultur sel (96 *wells*) dengan metode MTT (Mosmann, 1983) yang dimodifikasi. Stok dilarutkan dalam media RPMI 1640 sehingga diperoleh konsentrasi sampel dengan 10 seri pengenceran. Percobaan dimulai dengan $2-4 \times 10^3$ Cells/well dalam *plate* (96 *wells*), kemudian *plate* diinkubasi satu malam dalam media RPMI 1640 FBS 0,5%. Keesokan harinya media dibuang dan diganti dengan seri dosis sampel (n=4) dalam media RPMI 1640 FBS 10%. Kolom 1 digunakan sebagai kontrol sel, kolom 2 sebagai kontrol medium. Kontrol positif digunakan doksorubisin. Kultur sel tersebut diinkubasi selama 24 jam pada 37°C, 5% CO₂, kemudian larutan MTT (5 mg/ml PBS) ($10 \mu\text{l/well}$) ditambahkan pada sel. Kultur sel diinkubasi selama 4 jam pada 37°C, 5% CO₂. *Stop solution* ($100 \mu\text{l/well}$) ditambahkan pada sel di inkubasi selama semalam pada 37°C, 5% CO₂, kemudian *optical density* diukur pada λ 540 nm dengan ELISA *plate reader*.

D. ANALISIS DATA

Dilakukan penghitungan jumlah sel yang hidup, dibandingkan kontrol dengan memperhatikan pengaruh variasi kadar sampel terhadap kematian sel. Analisis sitotoksitas menggunakan analisis probit dan ditentukan nilai LC₅₀ dari masing-masing senyawa terhadap masing-masing sel. Analisis probit diperoleh dari konversi prosentase kematian ke nilai probitnya, prosentase kematian dihitung dengan cara sebagai berikut :

$$\% \text{Kematian} = \frac{(\text{?} A - \text{?} B) : \text{?} A}{\text{?}} \times 100\%$$

A : Jumlah sel hidup pada kontrol tanpa perlakuan.
B : Jumlah sel hidup karena perlakuan senyawa pada berbagai konsentrasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL ISOLASI SENYAWA DARI SERBUK AKAR PASAK BUMI

Metode isolasi yang digunakan merupakan modifikasi dari metode isolasi Chan *et al.* (2004) dan Kardono *et al.* (1991). Modifikasi dilakukan karena berdasarkan penelitian pendahuluan ada beberapa kelemahan dari kedua metode tersebut. Kelemahan metode Chan adalah banyak membutuhkan pelarut pada saat partisi dan fraksinasi serta HPLC preparatif yang alatnya sulit diperoleh dan mahal dalam operasionalnya. Kelemahan metode Kardono adalah membutuhkan banyak pelarut dan waktu isolasinya yang sangat lama. Perlu dilakukan modifikasi untuk mendapatkan metode isolasi dengan peralatan yang lebih sederhana, lebih sedikit biayanya dan lebih cepat.

Isolasi dilakukan dengan ekstraksi menggunakan cara maserasi. Metode ekstraksi dengan cara maserasi yang dipilih karena metode ini menggunakan ekstraksi dingin sehingga relatif tidak merusak senyawa yang kurang stabil dalam pemanasan. Larutan penyari yang digunakan adalah metanol, karena senyawa yang akan diambil bersifat polar dan sangat larut dalam metanol.

Tahapan setelah ekstraksi yaitu fraksinasi menggunakan *vacuum liquid chromatography* (VLC) dengan fase diam silika dan fase gerak yang menggunakan prinsip gradien polaritas (perbandingan fase gerak yang semakin polar). Tahap fraksinasi ini merupakan modifikasi dari metode isolasi Chan *et al.* (2004) yang menggunakan perbandingan fase gerak yang sama, tetapi fraksinasi Chan memakai kromatografi kolom gravitasi, sedang pada penelitian ini digunakan VLC. Penggunaan VLC lebih menguntungkan karena membutuhkan waktu yang relatif cepat dan dari hasil percobaan pendahuluan ternyata profil KLT hasil fraksinasi dengan kromatografi kolom hampir sama dengan profil KLT dari VLC sehingga dipilihlah metode VLC dalam fraksinasinya.

Purifikasi dalam penelitian ini digunakan KLT preparatif, dengan cara menotolkan bentuk pita dari fraksi 2 pada lempeng kaca 20 X 20 cm

yang telah dilapisi silika dan dielusasi dalam bejana kromatografi dengan fase gerak kloroform : metanol : air = 6,5 : 2,5 : 0,4. Isolat senyawa yang diambil adalah yang memiliki bercak yang sangat intens berfluoresensi biru di bawah UV 254 nm kemudian dikerok dan dipisahkan dari fase diamnya. Analisis kemurnian isolat tersebut dilakukan secara kromatografi lapis tipis menghasilkan 1 totolan yang bisa kita katakan bahwa isolat tersebut murni KLT. Profil KLT tersaji pada gambar 1.

B. HASIL IDENTIFIKASI STRUKTUR SENYAWA

Identifikasi dengan menggunakan spektroskopi UV dan IR perlu dilakukan untuk memastikan tipe struktur dari senyawa yang diisolasi. Spektra yang diperoleh dari spektroskopi diinterpretasi atau dielusidasi untuk mengetahui gugus fungsional yang ada pada struktur senyawanya.

Berdasarkan hasil spektra UV dari beberapa literatur mengatakan tidak banyak memberikan informasi untuk elusidasi struktur suatu senyawa,

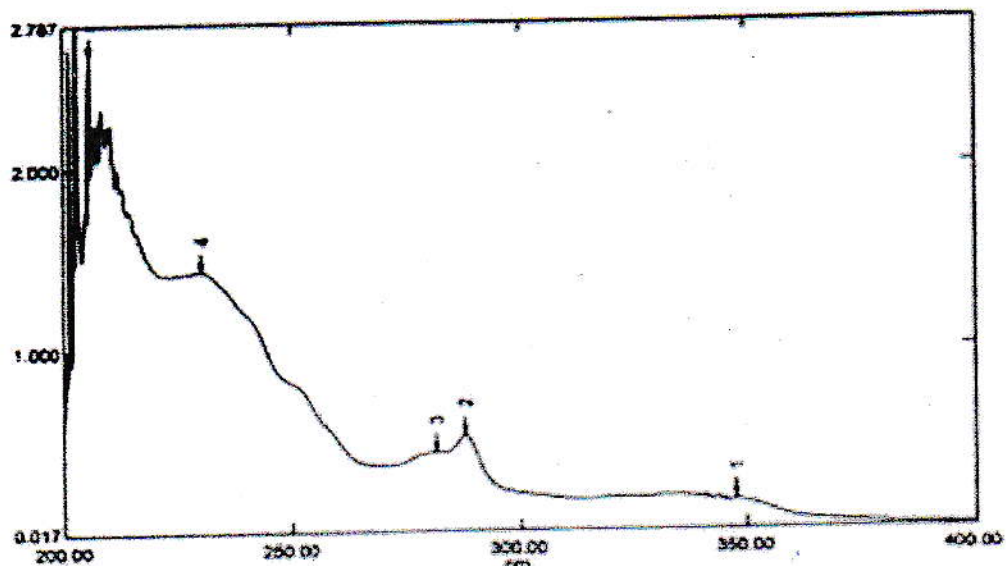
tapi dari spektra UV bisa diketahui ada tidaknya gugus kromofor dalam senyawa tersebut.

Pada spektra UV isolat (Gambar 2) menunjukkan adanya 4 peak dengan panjang gelombang maksimal 225 nm, hal ini menunjukkan bahwa struktur senyawa tidak banyak memiliki gugus kromofor atau ikatan rangkap terkonjugasi, sehingga berada di daerah ultraviolet (larutan tidak berwarna). Spektra infra merah menunjukkan gugus fungsional apa saja yang terdapat dalam suatu struktur.

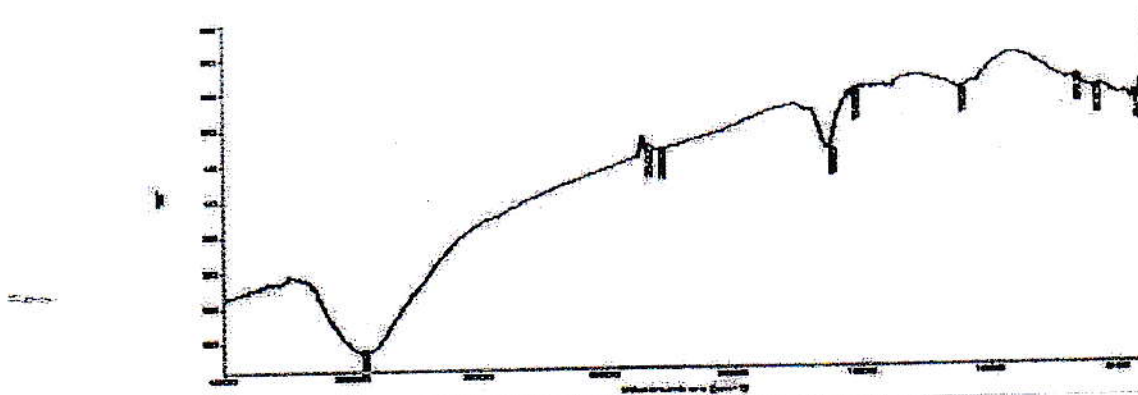
Hasil spektra IR dari isolat (Gambar 3) menunjukkan adanya peak yang tajam di daerah 1636 cm^{-1} yang disebabkan adanya gugus karbonil. Pita kuat dan lebar di daerah 3469.9 cm^{-1} merupakan ciri khas dari adanya gugus hidroksil. Pita yang lemah tapi tajam pada 1548 cm^{-1} menunjukkan adanya C-H alifatik, metil ataupun metilen. Pita yang lemah di daerah 2298 dan 2349 cm^{-1} mengindikasikan adanya gugus C=N. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa struktur dari isolat mengandung gugus C=O, OH, $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$, dan C=N.



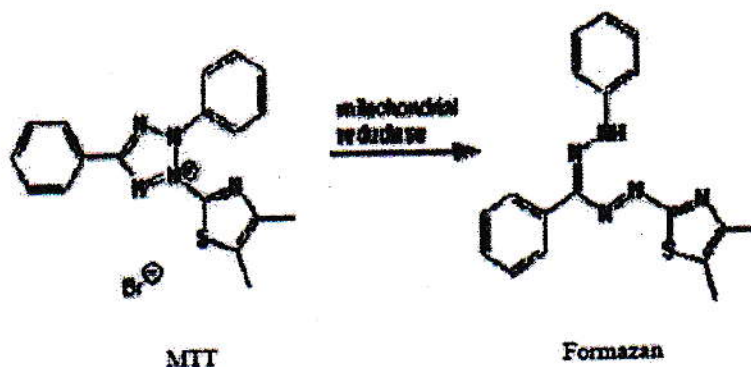
Gambar 1. KLT hasil purifikasi dilihat di bawah lampu UV 254 nm. fase diam : silika GF₂₅₄, fase gerak = kloroform: metanol : air = 6,5: 2,5: 0,4. A. Isolat hasil isolasi I B. Isolat hasil isolasi II (Rf=0,63).



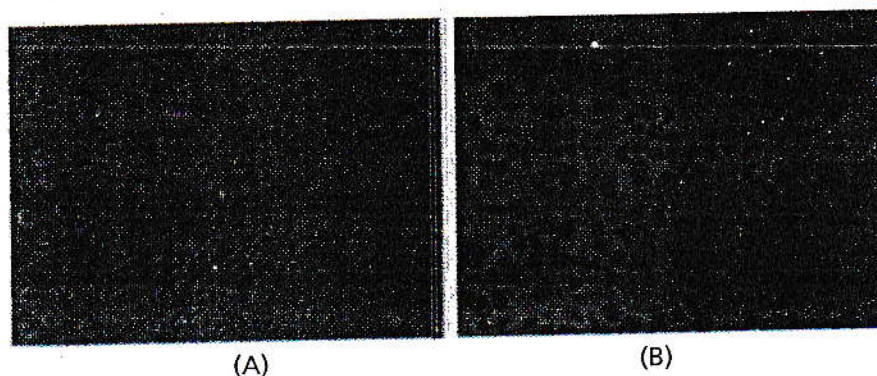
Gambar 2. Spektra UV isolat dengan pelarut metanol



Gambar 3. Spektra IR isolat senyawa



Gambar 4. Reaksi Reduksi MTT menjadi Formazan (Mosmann, 1983)



Gambar 5. Foto sel Hela ; A. Sel Hela hidup tanpa perlakuan larutan uji ; B. Sel Hela yang mati setelah perlakuan larutan uji.

C. HASIL UJI SITOTOKSISITAS DENGAN SEL HELA

Senyawa hasil isolasi ekstrak metanol akar pasak bumi dalam penelitian pendahuluan terbukti aktif sebagai anti angiogenesis (Salamah, 2008), sehingga perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk membuktikan potensi sitotoksiknya terhadap *cell line* dalam hal ini digunakan sel Hela yang merupakan jenis sel pada kanker servik.

Metode kuantifikasi sel yang digunakan pada uji sitotoksik isolat senyawa akar pasak bumi ini adalah metode MTT. Metode ini berdasarkan pada perubahan garam tetrazolium (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida) (MTT) menjadi formazan dalam mitokondria yang aktif pada sel

hidup. MTT diabsorpsi ke dalam sel hidup dan dipecah melalui reaksi reduksi oleh enzim reduktase dalam rantai respirasi mitokondria menjadi formazan yang terlarut dalam SDS 10% berwarna ungu (Doyle dan Griffiths, 2000). Konsentrasi formazan yang berwarna ungu dapat ditentukan secara spektrofotometri visibel dan berbanding lurus dengan jumlah sel hidup karena reduksi hanya terjadi ketika enzim reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria aktif (Mosmann, 1983). Semakin besar absorbansi menunjukkan semakin banyak jumlah sel yang hidup. Reaksi reduksi MTT dapat dilihat pada Gambar 4.

Gambaran sel hidup dan sel mati akibat perlakuan larutan uji dapat dilihat pada gambar 5.

Tabel 1. Kadar isolat dan prosentase kematian sel Hela

KADAR ISOLAT ($\mu\text{g/ml}$)	% KEMATIAN SEL HELA
125	26
62.5	16
31.25	7
15.6	6
7.8	5
3.9	2
1.95	1.5

Tabel 2. Kadar doksorubisin sebagai kontrol positif dan prosentase kematian sel Hela

KADAR DOKSORUBISIN ($\mu\text{g/ml}$)	% KEMATIAN SEL HELA
50	79
25	77
12.5	71
6.25	68
3.25	63

Hasil prosentase kematian sel akibat uji sitotoksisitas dengan menggunakan isolat senyawa hasil isolasi bisa dilihat pada tabel 1.

Kontrol positif digunakan doksorubisin dengan hasil yang bisa dilihat tabel 2. Doksorubisin dipilih karena merupakan obat anti kanker yang sudah dikenal ampuh membunuh sel kanker tapi memiliki efek samping yang besar karena juga membunuh sel normal.

Dari data pada tabel 1 dan 2, menunjukkan bahwa apabila dibandingkan antara isolat senyawa hasil isolasi akar pasak bumi dengan doksorubisin pada kadar yang sama, jumlah kematian sel Hela sebagai model sel pada kanker servik sangat jauh berbeda. Sangat jelas terlihat bahwa doksorubicin jelas lebih poten sebagai agen sitotoksik untuk mematikan sel kanker dibandingkan dengan isolat senyawa uji.

Pada uji sitotoksisitas isolat uji kadar tertinggi yaitu 125 $\mu\text{g/ml}$ hanya menunjukkan prosentase kematian sel sebesar 26 %, sehingga tidak bisa ditentukan nilai IC_{50} -nya. Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa isolat senyawa uji kurang poten sebagai agen sitotoksik pada sel Hela meskipun pada penelitian sebelumnya isolat tersebut poten sebagai agen anti angiogenesis (Salamah, 2008). Perlu dilakukan uji sitotoksisitas dengan *cell line* yang lain untuk lebih memastikan apakah isolat senyawa tersebut memang tidak memiliki potensi sitotoksik terhadap sel Kanker.

KESIMPULAN

1. Identifikasi struktur senyawa hasil isolasi ekstrak metanol akar pasak bumi secara spektrofotometri UV menunjukkan adanya gugus kromofor.
2. Identifikasi struktur senyawa hasil isolasi ekstrak metanol akar pasak bumi secara spektrofotometri IR menunjukkan gugus fungsional C=O, -OH, -CH₂-, -CH₃, dan C=N.
3. Senyawa hasil isolasi ekstrak metanol akar pasak bumi kurang poten pada uji sitotoksik dengan sel Hela.

DAFTAR PUSTAKA

- Ang, H. H., Lee K. L., Kiyoshi, M., 2004, Sexual arousal in sexually sluggish old male rats after oral administration of *Eurycoma longifolia*, *Jack, J. Basic Clin Physiol Pharmacol* 15 (3 - 4) : 303 - 309.
- Hanahan, D and Weinberg, R. A., 2000, The Hallmark of Cancer, *Cell*, 100 : 57 - 68.
- King, R. J. B., 2000, *Cancer Biology*, 2nd ed., Pearson Education Limited, London.
- Kuo P. C., Damu A. G., Lee K. H., Wu T. S., 2004, Cytotoxic and antimalarial constituents from the roots of *Eurycoma longifolia*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12 : 537 - 544.
- Nurhanan M. Y., Hawariah L. P. A, Ilham A. M., Shukri, M. A. M, 2005, Cytotoxic Effects of

the Root Extracts of *Eurycoma longifolia*,
Jack, Phytother. Res. 19 : 994 - 996.

alamah, 2009, Isolasi dan Identifikasi
eurikumanon Akar Pasak Bumi (*Eurycoma
longifolia* Jack) dan Efek anti angiogenesis
pada membran korio alantois (CAM) embrio
Ayam yang terinduksi bFGF, Tesis, Pasca
sarjana, Fakultas Farmasi, UGM, Yogyakarta.

engupta, S., Toh S. A., Sellers L. A., Skepper, J.
N., Koolwijk, P., Leung, H. W., Yeung H. W.,
Wong, R. N. S., Sasisekharan R., Fan, T. P. D,
2004, Modulating Angiogenesis : The Yin
and the Yang in Ginseng, *Circulation.* 110 :
1219 - 1225.

upardjan, A. M., dan Meiyanto, E., 2002, Efek
antiproliferatif pentagamavunon-0 terhadap
beberapa sel kanker, *Laporan Penelitian*,
Lembaga Penelitian Universitas Gadjah Mada,
Yogyakarta.