

STRATEGI PENCARIAN SENYAWA BIOAKTIF BARU DARI SUMBER BAHAN ALAMI TUMBUHAN

Partomuan Simanjuntak
 Puslit Bioteknologi-LIPI, Jalan Raya Bogor Km 46, Cibinong 16911
 Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Srengsengsawah, Jagakarsa, Jakarta
 E-mail: tomujtk@indo.net.id.

Abstract

Plants provide enormous chemical diversity. Advances in bioassay screening, isolation techniques and structural elucidation have shortened and facilitated the process of drug discovery from Indonesian medicinal plants. It is now general practice among natural product chemist and others field to use some strategy for investigate bioactive compounds from natural product.

Key words : Bioactive compounds, natural product.

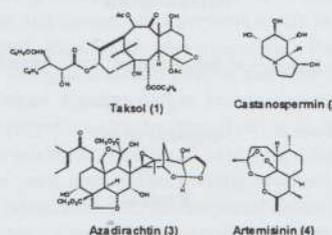
I. Pendahuluan

Indonesia adalah salah satu negara tropis yang kaya akan sumber daya alamnya, baik dari segi flora, fauna maupun mikroorganismenya. Kekayaan akan keanekaragaman sumber daya alam, khususnya tumbuhan sampai saat ini masih perlu digali dan dipelajari potensinya.

Indonesia memiliki sekitar 40.000 spesies tumbuhan yang tersebar di hutan-hutan tropis dari Sabang sampai Merauke. Ditinjau dari segi ilmu kimia setiap jenis tumbuhan merupakan penghasil puluhan bahkan ratusan jenis bahan kimia dengan arti kata hutan merupakan gudang bahan-bahan kimia untuk sebagai sumber obat, pestisida, makanan dan sumber bahan aktif lainnya (1).

Melihat kekayaan di atas, potensi tumbuhan hutan tropis Indonesia perlu dikembangkan karena prospek penggunaan tumbuh-tumbuhan sebagai sumber bahan bioaktif sangat menjanjikan. Senyawa Taksol (1) merupakan salah satu contoh hasil isolasi dari tumbuhan *Taxus brevifolia* (Taxaceae), memperlihatkan bahwa efektivitasnya sangat tinggi sebagai obat anti kanker dibandingkan dengan beberapa obat sintetik (2,3). Senyawa Castanospermine (2) merupakan senyawa penghambat virus HIV yang diperoleh dari tumbuhan *Castanospermum australe*. Azadiraktin (3) merupakan bahan insektisida yang diperoleh dari tumbuhan *Azadirachta indica* (4) dan artemisinin (qinghaosu, 4) yang merupakan obat anti malaria baru yang diperoleh dari tumbuhan tradisional China *Artemisia annua* (5,6). Penemuan tersebut menunjukkan bahwa dunia tumbuhan dapat disebut mewakili suatu wadah penyimpanan senyawa kimia baru. Dari 250.000 – 500.000 spesies tumbuhan yang terdapat di dunia ini, hanya sebagian kecil saja yang telah diteliti secara

fitokimia, pemeriksaan biologis maupun skrining secara farmakologis.



Gambar 1: Beberapa senyawa bioaktif hasil isolasi dari sumber daya alam tumbuhan

Hasil skrining, isolasi, pemurnian dan elusidasi struktur kimia maupun uji efektivitas sebagai bahan obat atau pestisida adalah merupakan hasil penelitian yang telah dilakukan dengan menggunakan strategi pencarian senyawa bioaktif baru dari dunia tumbuhan.

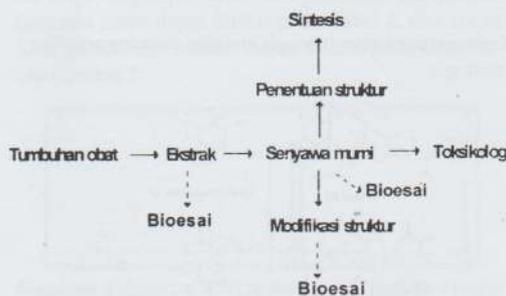
II. Strategi pencarian senyawa bioaktif baru dari sumber daya alam

Peluang untuk memanfaatkan sumber daya alami memang sangat besar dan sangat kompleks. Namun eksplorasi yang kurang terencana terutama terhadap tumbuhan dan penguasaan ilmu seperti bidang botani, farmakognosi, farmakologi, toksikologi, kimia bahan alam dan lain-lain masih belum terpadu. Maka diperlukan pendekatan untuk memperoleh sesuatu yang bermanfaat sebagai obat dengan pembuatan suatu strategi dalam pencarian senyawa bioaktif baru dari tumbuhan. Hostettmann dkk. (1991) dalam tulisannya temebuat

suatu formulasi yang dapat dilihat pada Gambar 2 (7). Formulasinya tersebut meliputi :

Gambar 2 (7). Formulasinya tersebut meliputi :

1. Seleksi, koleksi, identifikasi tumbuhan dan preparasi materi tumbuhan
2. Pemisahan dan ekstraksi dengan pelarut yang sesuai dengan analisis awal.
3. Skrining biologi dan farmakologi dari ekstrak kasar
4. Pemisahan kromatografi konstituen bioaktif murni yang dipandu oleh bioesai.
5. Penentuan struktur
6. Bentuk analisis dan farmakologi senyawa murni
7. Uji toksikologi
8. Sintesis parsial dan sistesis total
9. Preparasi turunan berguna untuk mempelajari hubungan aktivitas struktur kimia



Gambar 2. Skema pencarian senyawa bioaktif dari tumbuhan obat

III. Seleksi dan koleksi material tumbuhan

Untuk memperoleh senyawa kimia yang bermanfaat dalam waktu singkat, diperlukan pemilihan bahan tumbuhan secara hati-hati. Koleksi secara random merupakan satu cara yang dapat dilakukan, tetapi ini merupakan metode yang sangat mendasar pada penyeleksian tumbuhan dalam kriteria tertentu. Dengan cara menduga, tumbuhan obat tradisional dapat digunakan untuk mencari senyawa bioaktif secara farmakologis (8). Kelompok peneliti dari Universitas Osaka, Jepang melakukan eksplorasi tumbuhan obat tradisional Indonesia dengan cara memperoleh informasi dari dukun setempat, kemudian melakukan identifikasi tumbuhan dan selanjutnya ekstraksi, pemurnian, elusidasi dan uji bioesai terhadap hasil senyawa isolat murni (9,10).

Pemilihan tumbuhan secara kemotaksonomi adalah merupakan suatu kemungkinan lain. Sebagai contoh, jika suatu pencarian senyawa xanton dari suatu tumbuhan yang sedang dilakukan, maka hal tersebut dapat diusulkan untuk memulai dengan investigasi kelompok

atau keluarga tumbuhan lain yang diketahui mengandung kelas senyawa tersebut dari produk alami seperti dari keluarga Gentianaceae, Polygalaceae.

Bidang penelitian senyawa insektisida juga dapat dikatakan sangat menarik. Bila suatu tumbuhan nampak tidak memiliki tanda-tanda suatu penyerangan oleh serangga dan tidak dapat dimakan oleh spesies akibat adanya beberapa organisme asing. Hal ini merupakan kesempatan baik bagi peneliti untuk mempelajari metabolisme yang ada, dimana zat kimia aktif yang terdapat pada tumbuhan tersebut dapat bertindak sebagai suatu zat insektisida atau anti mikroorganisme.

Ekstrak dari tumbuhan yang ditambahkan dengan air dan dikocok kuat dan menghasilkan busa menunjukkan adanya pembentukan senyawa saponin. Dengan cara ini akan lebih mudah dan cepat untuk mencari senyawa bioaktif saponin baru.

IV. Ekstraksi

Ragam ekstraksi yang tepat tergantung pada tekstur dan kandungan air bahan tumbuhan yang diekstraksi dan pada jenis senyawa yang diisolasi. Umumnya kita perlu "membunuh" jaringan tumbuhan untuk mencegah terjadinya oksidasi enzim atau hidrolisis. Melarutkan jaringan daun segar atau kering (atau bagian lainnya), bila perlu dipotong-potong dan diekstraksi dalam etanol mendidih adalah suatu cara yang baik untuk mencapai tujuan itu. Alkohol, bagaimanapun juga adalah pelarut serba guna yang baik untuk ekstraksi pendahuluan. Selanjutnya, bahan dapat dimaserasi dalam suatu pelarut, lalu disaring. Tetapi hal ini hanya diperlukan bila kita ingin mengekstraksi secara total.

Pada prosedur ekstraksi terdapat jalan pintas yang dapat dipelajari dari pengalaman. Misalnya, bila mengisolasi kandungan senyawa dari jaringan daun yang larut dalam air, seharusnya senyawa lipid dapat dihilangkan pada tahap dini sebelum pemekatan, yaitu dengan mencuci ekstrak berulang-ulang dengan eter minyak bumi. Kenyataannya, bila ekstrak etanol diuapkan dengan penguap berpusing, hampir semua klorofil dan lipid melekat pada dinding labu. Dengan keterampilan, pemekatan dapat dilakukan tepat sampai suatu saat tertentu sehingga larutan air yang pekat dapat dipipet hampir tanpa mengandung lemak.

Bila kita ingin menelaah profil fitokimia lengkap dari suatu jenis tumbuhan maka sebelum kromatografi, ekstrak kasar perlu difraksinasi untuk memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari golongan utama lainnya. Analisis tumbuhan yang mengandung bermacam-macam golongan senyawa kimia berdasarkan perbedaan kepolarannya dapat dilakukan dengan cara prosedur pada Gambar 2. Jumlah dan jenis senyawa



yang dapat dipisahkan menjadi fraksi tersendiri sudah tentu berbeda tergantung pada jenis tumbuhannya (11).



Gambar 3. Cara umum ekstrak jaringan tumbuhan dan fraksinasi ke dalam golongan pelarut yang berlainan

V. Metoda-metoda Pemisahan

Kunci program yang berhasil adalah dilibatkannya pencarian komponen tumbuhan bioaktif secara biologi dengan pemilihan teknik kromatografi untuk memisahkan senyawa-senyawa murni. Tujuannya adalah untuk memperoleh hasil maksimum dengan usaha minimum (melalui pengurangan waktu dan biaya prosedur pemisahan). Teknik pemisahan preparatif dapat memakan banyak waktu, khususnya bila terdapat campuran senyawa kompleks. Beberapa teknik baru seperti Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), Kromatografi cair spektrometri masa (KCSM), Kromatografi gas spektrometri masa (KGSM) sudah banyak diperkenalkan dan menunjukkan keunggulan, yaitu analisis yang cepat dan mudah untuk memecahkan masalah-masalah pemisahan yang sulit (12,13). Akan tetapi tidak ada teknik yang umum dapat memecahkan setiap masalah dalam teknik isolasi. Setiap metode mempunyai keunggulan dan keterbatasan, sehingga untuk memperoleh hasil terbaik dapat dilakukan kombinasi dua atau lebih metode-metode diatas.

Beberapa teknik pemisahan preparatif yang sangat penting dalam usaha isolasi dan pemisahan senyawa kimia dapat dilihat pada Tabel 1. menunjukkan bahwa pemisahan dapat dilakukan berdasarkan fase yang digunakan.

Tabel 1. Metoda pemisahan preparatif untuk sampel tumbuhan

Kromatografi fase padat

Kromatografi kertas
KLT preparatif, KLT sentrifugal
Kromatografi kolom terbuka
Kromatografi cair tekanan rendah
Kromatografi kolom bertekanan rendah, Kromatografi flash
Kromatografi Cair kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi Cair-cair

Distribusi Craig
Droplet Countercurrent Chromatography
Rotation Locular Countercurrent Chromatography
Centrifugal
Partition Chromatography

VI. Kromatografi

Salah satu teknik kromatografi yang sering dipakai untuk pemisahan suatu zat campuran adalah Kromatografi Lapis Tipis (KLT). KLT ini dapat dipakai dengan dua tujuan, yaitu pertama untuk mencapai hasil kualitatif, kuantitatif, atau preparatif. Kedua, dipakai untuk menajaki sistem pelarut dan sistem penyangga yang akan dipakai dalam kromatografi kolom atau kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Kromatografi kolom adalah kromatografi cair yang dilakukan dalam kolom yang merupakan metoda kromatografi terbaik untuk pemisahan sampel campuran dalam jumlah besar (> 1 gram). Analisis kromatografi kolom ini memerlukan teknik pembuatan fase diam (kolom/adsorpsi) yang tepat. Pembuatan kolom ini harus memperhitungkan material/sampel yang akan dianalisis dengan homogenitas sampel dan jumlah adsorben yang digunakan. Beberapa peneliti di Jepang telah menggunakan suatu teknik homogenisasi ini yang disebut dengan sistem "Mabushi" yaitu homogenisasi sampel dengan celite 535/celite 545.

VII. Bioesai

Hal penting bagi setiap penelitian dalam mencari senyawa aktif dari tumbuhan yang berhubungan dengan aktivitas biologi adalah keharusan melakukan bioesai yang sesuai untuk memonitor pengaruh yang dibutuhkan. Untuk mengatasi banyaknya ekstrak komponen maupun fraksi-fraksi komponen yang optimal, metode fraksinasi yang berpedoman pada bioaktivitas (bioactivity-guided fractionation) sangat diperlukan. Sistem pengujian ini harus sederhana, dapat berulang, dapat dihasilkan kembali dan tidak mahal. Bila senyawa aktif hanya diperoleh pada konsentrasi rendah dalam ekstrak kasar, bioesai itu harus mempunyai sensitivitas deteksi yang cukup tinggi. Hal yang perlu

diperhatikan juga adalah bahwa kesalahan-kesalahan harus diminimalkan. Faktor lain yang berhubungan dengan ekstrak-ekstrak tumbuhan adalah kelarutan sampel dan penemuan pelarut yang sesuai dapat mempermudah pemecahan masalah tersebut.

Saat memutuskan untuk melakukan bioesai, langkah pertama adalah memilih target yang sesuai. Hal ini dapat dilakukan mulai dari organisme yang lebih rendah (misalnya bakteri, jamur, serangga, Crustaceae atau Mollusca), sistem subseluler yang diisolasi (seperti enzim, reseptor atau organel), kultur sel (dari manusia atau hewan), organ yang diisolasi (dari vertebrata atau semua jenis hewan). Salah satu teknik pencarian senyawa bioaktif dari tumbuhan obat melalui bioesai adalah uji pendahuluan dengan Brine Shrimp Lethality Test (14). Beberapa bioesai yang dapat dilakukan secara sederhana dapat dilihat pada Tabel 2.

Penggunaan kultur sel dalam pencarian komponen anti kanker yang menggunakan jaringan sel manusia (Human cell Lines) seperti sel KB dan P388 secara rutin telah banyak dipakai untuk skrining awal dari hasil ekstraksi hingga hasil fraksinasi (15). Jaringan sel tersebut kini hampir seluruhnya dapat digantikan dengan sel turunan yang dibuat dari variasi tumor padat pada manusia (16).

VIII. Elusidasi Struktur Kimia

Elusidasi struktur kimia senyawa hasil isolasi ditentukan berdasarkan interpretasi data-data spektroskopi seperti Ultra Lembayung (UL), Infra Merah (IM), Spektrometri massa (SM), Resonansi Magnet Inti (RMI proton dan karbon) (17). Data-data spektroskopi ini masing-masing mempunyai kegunaan spesifik yang saling berhubungan satu sama lain dalam menginterpretasi data. Ultra lembayung menunjukkan adanya gugus kromofor, infra merah memberikan informasi adanya gugus fungsional seperti hidroksil (OH), karbonil (C=O) dan lain-lain, dan spektrometri massa menyatakan bobot molekul dan fragmentasi (pemecahan) senyawa yang dielusidasi. Sedangkan RMI (proton dan karbon) memberikan sinyal-sinyal adanya proton dan jumlah karbon (CH₃, CH₂, CH dan C). Data-data lain yang penting diketahui untuk senyawa baru adalah adanya spektra dua dimensi (2D) RMI seperti ¹H-¹H COSY (Correlation Spectroscopy), ¹H-¹³C COSY, HMBC (Heteronuclear Multibond Connectivity), COLOC (Correlation Spectroscopy via Long-range Coupling) dan INADEQUATE (Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment). Kegunaan data dari RMI 2 dimensi ini dapat menunjukkan korelasi antara proton dengan proton lain, proton dengan karbon, dan

karbon dengan karbon (18,19). Perkembangan teknik spektroskopi ini telah mencapai titik kulminasi sehingga senyawa isolat yang diperlukan untuk pengambilan data-data spektra cukup dalam jumlah yang sangat kecil (1-5 mg). Untuk senyawa yang bukan baru, identifikasi senyawa dapat dilakukan dengan cepat melalui perbandingan berdasarkan data KLT (dengan 3 sistem pelarut yang berbeda), KCKT, IM, UV dan RMI 1 dimensi, maupun membandingkan dengan data yang ada pada daftar pustaka.

Tabel 2. Beberapa bioesai yang banyak digunakan

No	Aktivitas	Target
1	Antibakteri	Bakteri patogen manusia/tumbuhan (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Erwinia</i> spp.)
2	Antijamur	Jamur patogen manusia/tumbuhan (<i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus</i> spp., <i>Cladosporium</i> spp.)
3	Brine shrimp toxicity	<i>Artemia salina</i>
4	Crown gall tumor inhibition	Sel kentang (<i>S. tuberosum</i>), akar umbi yang ditransformasi oleh <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
5	Anti mitotic	<i>Strangolaccitratus</i> spp.
6	Larvasida	<i>Spodoptera</i> spp., <i>Epilachma varivestis</i>
7	Mblusidal	<i>Biomphalaria glabrata</i>

IX. Penutup

Strategi pencarian senyawa bioaktif baru untuk obat-obatan dari bahan alami Indonesia adalah merupakan kunci sukses penelitian dan pengembangan obat tradisional Indonesia menjadi suatu obat kemoterapi yang dikenal secara nasional maupun internasional. Diperlukannya kerja sama yang baik antara berbagai disiplin ilmu seperti kimia bahan alam, botani, farmakologi, farmakognosi maupun toksikologi adalah suatu keharusan untuk mencapai target ini. Sehingga tidak ada lagi yang penelitian yang mubazir, dimana seorang peneliti bidang kimia bahan alam menyatakan telah menemukan senyawa baru tetapi tidak mengetahui kegunaan senyawa tersebut, sedangkan seorang peneliti bidang farmakologi menemukan suatu senyawa yang berpotensi untuk obat tetapi tidak mengetahui struktur kimia senyawa tersebut.

X. Daftar Pustaka

1. Croasman WR, Carlson RM. Two dimensional NMR spectroscopy, application for chemists and biochemists. VCH Publishing; 1994.
2. Derome AE. Modern NMR techniques for chemistry research. Pergamon Press; 1988.

3. Geran RI, Greenberg NH, McDonald MM, Schumacher AM, Abbott BJ. Protocols for screening chemical agents and natural product against animal tumors and other biological systems, cancer chemotherapy reports 3; 1972.
4. Gupta MM, Jain DC, Mathur AK, Singh AK, Verma RK, Kumar S. *Planta medica* 62;1996.
5. Harborne JB. Metode fitokimia penuntun cara modern menganalisis tumbuhan. Bandung: ITB; 1987.
6. Hostettmann K, Hamburger M, Hostettmann M, Marston A. New developments in the separation of natural products In : Fischer NH, Isman MB, Stafford HA. *Modern phytochemical methods*. Plenum Press;1991.
7. Hostettmann K, Hostettmann M, Marston A. Preparative chromatographic techniques : application in natural products isolation. Berlin: Springer-Verlag; 1986.
8. Huxtable RJ. The pharmacology of extinction, *journal of ethnopharmacology* 37. 1992.
9. Kitagawa I, Shibuya H. Pharmacochemical investigation of Indonesian medicinal plants In : Hostettmann et al. *Phytochemistry of plants used in traditional medicine*. Clarendon Press-Oxford; 1995.
10. Kitagawa I, Simanjuntak P, Hori K, Nagami N, Mahnud T, Shibuya H, Kobayashi M. Indonesian medicinal plant vii. seven new clerodane-type diterpenoids, peronemins a2, a3, b1, b2, b3, c1, and d1 from the leaves of *Peronema canescens* (Verbenaceae). *Chem. Pharm. Bull.* 42; 1994.
11. Marston A, Hostettmann K. *Modern separation method, natural product reports* 8. 1991.
12. Mayer BN, Ferigni JT, Putnam LB, Jacobsen DE, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp, a convenient general bioassay for active plant constituent. *Planta Medica* 95; 1995.
13. Rifai MA, Anggadiredja J. Keanekaragaman plasma nuftah tumbuhan obat indonesia, penanganan penelitian, pengembangan, pemanfaatan dan pelestariannya. *Buletin DRN* 30; 1996.
14. Schroeder DR, Nakanishi K. *Journal of natural product* 50.1987.
15. Shoemaker RJ, Monks A, Alley MC, Scudiero DA, Fine DL, McLamore TL, Abbott BJ, Paull KD, Mayo JG, Boyd MR. Development of human tumor cell line panels for use in disease-oriented drug screening. In : Hall TC. *Prediction of response to cancer therapy*. 1988.
16. Silverstein RM, Bassler C, Morrill TC. *Spectrometric identification of organic compounds*. John Wiley & Sons; 1981.
17. Swindell CS, Krauss NE. Biologically active taxol analogues with delete a ring side substituents and variable C-2' configured. *Med. Chem.* 34; 1991.
18. Tan RX, Zheng WF, Tang HQ. Biologically active substances from the Genus *Artemisia*. *Planta Medica* 64; 1998.
19. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggum P, McPhail AT. Plant antitumor agents VI. The isolation and structure of antitumor of taxol, A novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Soc.* 93; 1991.