

KARAKTERISASI DAN UJI BIOAKTIVITAS SENYAWA KIMIA ANTI TUBERCULOSIS (TBC) PADA SPONS *PETROSIA ALFIANI* DARI PERAIRAN SELAT MAKASSAR

Abd.Rahman¹⁾, Ibtisamatul Aminah¹⁾, Ali Muhakim¹⁾

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.
Email: elnino_genkg@rocketmail.com; ibthy.chemistry10@yahoo.com; alimuhakim@ymail.com

Abstract

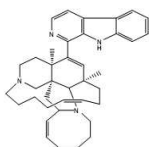
This study is intended to take advantage of the chemical compounds contained in sponge species *Petrosia alfiani* as anti tuberculosis (TB). This study through the stages isolation, extraction, identification and bioactivity testing of chemical compounds *Petrosia alfiani* sponge. In this study produce chloroform extract as much as 20 g of solid resulting from 20 Kg wet sponge and also produce 4 pieces of pure compounds are not yet known its name.

Keyword: *Petrosia alfiani* sponge, isolation, identification, bioactivity testing, chemical compounds.

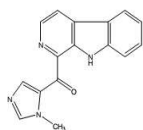
1. PENDAHULUAN

Spons laut memiliki potensi bioaktif yang sangat besar. Selama 50 tahun terakhir telah banyak kandungan bioaktif yang telah ditemukan. Kandungan bioaktif tersebut dikelompokkan beberapa kelompok besar yaitu antinflamatory, antitumor, immunosuppressive, antivirus, antimalaria, antibiotik, dan antifouling (Rasyid, 2009).

Spons *Petrosia hoeksemai* dilaporkan mengandung alkaloid manzamine. Dua metabolit sekunder telah diisolasi dari spons *Petrosia* (*Petrosia*) Hoeksemai yang dikoleksi dari Pulau Menjangan, Bali-Indonesia. Senyawa tersebut adalah manzamine A dan xestomanzamine A. Senyawa alkaloid manzamine diketahui memiliki aktivitas antimalaria dan anti-HIV (Murti, 2006).



Gambar 1. Manzamine A



Gambar 2. Xestomanzamine A

Dua senyawa yang diisolasi dari spons *Petrosia sp.* adalah senyawa alkaloid yang menunjukkan tingkat toksisitas cukup

tinggi terhadap larva *A. salinadengan* LC50 masing-masing sebesar 7,23 (isolat 1) dan 5,69 µg/mL. Sitotoksitas terhadap sel myeloma menunjukkan nilai LC50 masing-masing sebesar 16,95 µg/mL (isolat 1) dan 18,8 µg/mL (isolat 2). Semakin lama waktu pemberian, kedua isolat tersebut semakin toksik yang ditunjukkan dengan semakin rendahnya LC50 (Astuti, 2005).

Senyawa bioaktif ditemukan dari sekitar 11 genera spons. Tiga genera spons yaitu Haliclona, *Petrosia* dan *Discodemia* memiliki efek antikanker yang sangat kuat (Jha dan Zi-rong, 2004). *Petrosia sp.* yang berasal dari perairan Korea mengandung senyawa bioaktif poliasetilen yang termasuk dalam golongan alkohol. Senyawa ini memiliki aktifitas sitotoksik yang kuat terhadap sel tumor leukemi pada manusia (K-562) (Seo, dkk., 1999), dapat menghambat replikasi DNA secara in vitro (Kim, dkk., 2002) dan dapat menginduksi apoptosis pada sel melanoma kulit manusia (Cho, dkk., 2004).

Jenis spons *P. alfiani* ini ditemukan diperairan laut Indonesia namun belum pernah diteliti kandungan kimianya. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai isolasi senyawa metabolit

sekunder dari spons jenis *P. alfiani* dan uji bioaktivitas sebagai anti tuberculosis.

2. METODE

a. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain spons *P. alfiani*, larutan metanol teknis, n-heksana p.a dan teknis, etil asetat p.a dan teknis, aseton p.a dan teknis, kloroform p.a., larutan NaCl 0.9%, silika gel tipe 7733;7734;7730, plat KLT, biakan murni *M. tuberculosis*, kapas, isoniazid, streptomisin, etionamid, medium Loewenstein Jensen, OADC dan kultur *M. tuberculosis* H37Rv.

b. Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan antara lain peralatan gelas yang umum digunakan di dalam laboratorium, rotary evaporator, timbangan digital, perangkat destilasi Vigreux kromatografi kolom tekan, alat KLT (bak KLT, pipa kapiler, pensil, cutter dan mistar), cawan petri, inkubator, microplate, spektrometri 20, vial, lampu UV Varian Conc 100, IR Shimadzu FT-IR, NMR, dan MS.

c. Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei-Agustus 2013 di laboratorium kimia organik Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.

d. Metode Pendekatan

1. Ekstraksi

Sampel yang telah dikeringkan kemudian digerus dan ditimbang bobot keringnya sebanyak 4 kg. Sampel kering kemudian dimaserasi dengan menggunakan metanol selama 1×24 jam. Maserasi diulangi dengan volume metanol yang sama beberapa kali. Hasil maserasi kemudian ditampung untuk diuapkan menggunakan alat rotavapor.

Ekstrak metanol hasil penguapan dipartisi dengan n-heksana dan kemudian diuapkan kembali dengan menggunakan evaporator. Ekstrak metanol sisa kemudian dipartisi dengan kloroform dan selanjutnya

diuapkan lagi dengan menggunakan evaporator. Ekstrak metanol sisa dari partisi kloroform kemudian dipartisi lagi dengan menggunakan etil asetat. Fraksi etil asetat kemudian ditampung untuk diuapkan dengan menggunakan rotavapor. Hasil penguapan dari fraksi kloroform lalu diuji bioaktivitasnya dan dianalisis dengan KLT.

2. Isolasi

Ekstrak fraksi kloroform yang telah dikurangi pelarutnya kemudian dipisahkan fraksi-fraksinya dengan memakai kromatografi kolom. Fraksinasi dilakukan dengan kromatografi kolom tekan (KKT), dengan menggunakan eluen yang bervariasi. Hasil fraksinasi dianalisis dengan KLT menggunakan eluen yang sesuai agar dapat menggabungkan fraksi-fraksi yang sama.

Analisis dengan KLT dilakukan dengan menggunakan berbagai variasi pelarut. Maserat ditotolkan pada plat KLT yang memiliki silika gel sebagai adsorben lalu dimasukkan di dalam tabung yang telah dijenuhkan dengan eluen. Noda dari hasil totolan pada base line bergerak berdasarkan perbedaan kepolaran dan dihasilkan noda-noda. Sistem ini dilakukan dengan prinsip trial and error guna mencari eluen yang sesuai untuk fraksinasi. Eluen yang digunakan dapat berupa campuran dua atau tiga pelarut. Kromatogram yang baik ditandai dengan terpisahnya masing-masing noda. Dari noda tersebut akan dihitung nilai R_f -nya. Senyawa murni harus menunjukkan noda tunggal pada tiga macam sistem eluen.

3. Identifikasi

Pada tahap ini senyawa murni yang diperoleh diuji kemurniannya dengan mengukur titik leleh dan juga analisis KLT pada tiga macam sistem eluen. Data spektroskopi untuk penetapan struktur diperoleh dengan mengukur senyawa murni melalui alat spektroskopi UV, FT-IR, NMR dan MS.

4. Uji Bioaktivitas Anti Tuberculosis (TBC)

*Microbacterium tuberculosis*H37Rv yang diperoleh dari American Type Culture Collection (Rockville, Md.). Semua kultur akan ditumbuhkan pada media cair Middlebrook 37H9 (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) dengan kompleks oleic acid-bovine serum albumin dextrose catalase (OADC) (Difco) pada suhu 37°C, dan diagitasi kuat sekali sehari. Untuk inokulum dibuat suspensi *M. tuberculosis* dalam NaCl 0.85 pada turbiditas Standar No. 1 McFarland (OD 0,257 pada 600 nm) yang mengandung sekitar 3×10^8 CFU/ml.

Medium Loewenstein Jensen (Difco) dibuat sesuai instruksi pabrik dan sebelum diinsipisasi ditambahkan dengan senyawa hasil isolasi dengan konsentrasi akhir dalam medium sebanyak 1, 2, 3, dan 4 g/100 mL. Medium yang mengandung senyawa hasil isolasi diinsipisasi secara miring dalam tabung reaksi didalam inkubator selama dua kali 45 menit berselang 24 jam. Inokulum *M. tuberculosis*H37Rv dengan turbiditas standar No. 1 McFarland yang telah disiapkan sebelumnya, diinokulasi pada setiap medium yang mengandung senyawa hasil isolasi dan diinkubasi selama 5 pekan. Setelah 5 pekan konsentrasi minimum setiap ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan *M. tuberculosis* diamati.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

a. Penyiapan Sampel

Sampel yang basah dikeringkan selama beberapa hari untuk menghilangkan kandungan airnya. Setelah kering lalu dihaluskan untuk selanjutnya dimaserasi.

b. Ekstraksi

Pada tahap dilakukan ekstraksi senyawa yang pada sampel dengan metode maserasi selama 4x24 jam menggunakan metanol. Setelah itu akan didapatkan ekstrak methanol cair yang kemudian dipekatkan menggunakan rotary evaporator. Ekstrak methanol yang pekat kemudian diekstraksi cair-cair menggunakan kloroform, akan

didapatkan ekstrak kloroform yang cair. Ekstrak kloroform ini kemudian di analisis dengan menggunakan metode KLT untuk mencari eluen yang baik dan sesuai yang akan digunakan pada tahap selanjutnya. Eluen yang digunakan adalah perbandingan antara n-heksana:etil asetat dan n-heksana:aseton. Pada proses ini didapatkan perbandingan eluen yang sesuai yaitu n-heksana:aseton 6:4. Setelah didapatkan eluen yang sesuai maka ekstrak kloroform yang cair kemudian dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator yang selanjutnya dikeringkan.

c. Isolasi

Sampel yang sudah kering pada tahap diatas kemudianditimbang (didapatkan sebanyak 10 g) dan diimprek dengan menggunakan siliki gel tipe 7734. Sampel yang telah diimprek kemudian di partisi dengan menggunakan metode KKV (kromatografi kolom vakum) dengan eluen n-heksana:aseton pada berbagai perbandingan dan silika gel tipe 7730. Dari proses ini akan didapatkan beberapa fraksi.

Setelah itu, kemudian dianalisis dengan KLT untuk mencari noda yang sama yang kemudian akan digabung. Setelah digabung, salah satu fraksi kemudian di KLT lagi untuk mencari eluen yang sesuai untuk tahap selanjutnya (tahap ini diambil perbandingan 6:4).

Fraksi ini kemudian di KLT dengan eluen n-heksana:etil asetat pada berbagai perbandingan dan didapatkan pemisahan senyawa yang baik pada perbandingan 7:3. Setelah itu, dilanjutkan ke tahap berikutnya yaitu KKG (kromatografi kolom gravitasi). Pada tahap ini juga didapatkan beberapa fraksi, fraksi-fraksi ini kemudian dianalisis dengan KLT untuk melihat noda yang sama. Dari analisis ini didapatkan beberapa noda yang sama dan juga didapatkan beberapa noda yang sudah tunggal.

Noda tunggal yang didapatkan tersebut kemudian di KLT 2 dimensi untuk memastikan apakah betul senyawa tersebut sudah murni. Namun pada saat dilakukan

KLT 2 dimensi, masih didapatkan ada pengotor didalam senyawa tersebut. Olehnya itu dilakukan preparatif untuk memisahkan senyawa dengan pengotornya. Metode ini menggunakan kaca preparatif dan eluen n-heksana:etil asetat 7:3.

Hasil dari proses ini didapatkan 6 fraksi yang dimana 4 dari fraksi tersebut sudah memberikan noda tunggal yang nantinya akan diidentifikasi dan uji bioaktivitas.



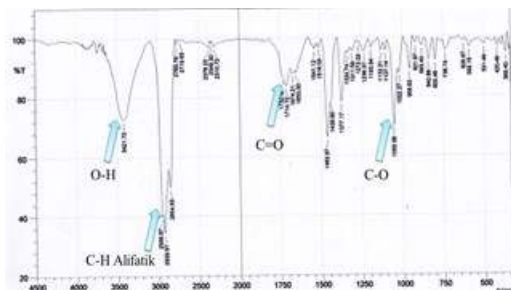
Gambar 3. Enam fraksi hasil KLT preparatif



Gambar 4. Fraksi murni hasil isolasi

d. Identifikasi

Proses identifikasi dilakukan dengan menggunakan instrumen FTIR.



Gambar 5. Hasil FTIR dari fraksi 3 yang telah murni.

- O-H, berada pada daerah $3421,72 \text{ cm}^{-1}$
- C-H Alifatik, berada pada daerah $2956,87$ sampai $2854,65 \text{ cm}^{-1}$
- C=O, berada pada daerah $1732,08 \text{ cm}^{-1}$
- C-O, berada pada daerah $1055,06 \text{ cm}^{-1}$

e. Uji Bioaktivitas

Sama halnya dengan proses identifikasi, uji bioaktivitas pun tidak dapat dilaksanakan dikarenakan alasan yang serupa dengan diatas.

4. KESIMPULAN

1. Ekstraksi senyawa spons *Petrosia alfiani* dengan menggunakan pelarut kloroform menghasilkan 20 g ekstrak kloroform padat dari 20 Kg ekstrak basah.
2. Isolasi senyawa kimia menghasilkan 4 buah senyawa murni.
3. Hasil identifikasi menunjukkan adanya gugus karboksilat dalam senyawa tersebut.

5. REFERENSI

- Astuti P, Alam G, Wahyuono S. 2005. Bioactivity screening of spongs collected from Bunaken, Menado by brine shrimp lethality test against *Artemia salina* Leach. *Majalah Farmasi Indonesia*. Hlm 238 – 243.
- Cho H. J, Ja Bae S, Kim N. D, Jung H. J, Cho Y. H. 2004. Induction of Apoptosis by Dideoxypetrosynol A, A Polyasetylene from Spongs *Petrosia* sp., in Human Skin Melanoma Cells. *International Journal of Molecular Medicine*. Hlm 1091-1096.
- Jha R. K, Zi-rong X. 2004. Biomedical compounds from marine organism. *Marine Drugs*. Hlm 123 – 146.
- Kim D. K, Lee M. Y, Lee H. S, Lee D. S, Lee J. R, Lee B. J, Jung J. H. 2002. Polyacetylenes from a marine spongs *Petrosia* sp. inhibit DNA replication at the level of initiation. *Cancer Lett*. Hlm 95–101

- Murti Y. B. 2006. Isolation and structure elucidation of bioactive secondary metabolites from sponss collected at Ujungpandang and in the Bali Sea, Indonesia. Hlm 11-15.
- Rasyid A. 2009. Senyawa – Senyawa Bioaktif dari Spons. Oseana. Hlm 25-32.
- Seo Y, Cho K. W, Lee H. S, Rho J. R, Shin J. 1999. New acetylenic enol ethers of glycerol from the spons *Petrosia* sp. J. Nat. Prod. Hlm 122–126.