

**STUDI PENDAHULUAN
PEMURNIAN EKSTRAK BIJI KEMALAKIAN (*Croton tiglium*)
DENGAN TEKNIK *SOLID PHASE EXTRACTION* (SPE)**

Yuningsih dan R. Damayanti

Balai Besar Penelitian Veteriner
Jl. R.E. Martadinata 30 Bogor

(terima tgl. 03/03/2010 – disetujui tgl. 25/11/2010)

ABSTRAK

Ketersediaan obat sintetik untuk pengobatan penyakit HIV sangat terbatas, sehingga diperlukan pengembangan metode analisis Phorbol 13-decanoate (derivat *phorbol ester*) dalam ekstrak metanol dan petroleum eter biji kemalakuan (*Croton tiglium*) sebagai obat alternatif. Penelitian ini merupakan studi pendahuluan isolasi derivat *phorbol ester* dengan teknik *solid phase extraction* (SPE) sebagai bahan aktif penghambat proliferasi *human immunodeficiency* (HIV). Biji kemalakuan dikoleksi dari Kebun Percobaan Balitro dan diekstraksi dengan metanol dan petroleum eter kemudian ekstrak dimurnikan dengan menggunakan *cartridge C₁₈* dan dielusi dengan masing-masing pelarutnya. Hasil masing-masing elusi dikeringkan dengan alat *rotary evaporator* dan dispotkan pada plat kromatografi lapis tipis (KLT silika gel 60 F₂₅₄). Hasil konfirmasi metode dengan uji perolehan kembali menunjukkan cukup baik, yaitu 125 dan 115% dengan 3 ulangan dari masing-masing ekstrak. Kandungan *Phorbol 13-decanoate* dalam ekstrak metanol dan ekstrak petroleum eter masing-masing 2.500 dan 115 ppm.

Kata kunci : Analisis phorbol 13-decanoate, biji *Croton tiglium*, SPE, obat herbal HIV

ABSTRACT

Preliminary study on purification of Croton tiglium seed extract by solid phase extraction technique (SPE)

The availability of several chemical drugs for HIV medication is very limited, therefore developing method for analysis of phorbol 13-decanoate in methanol extract of Croton tiglium seeds was needed to provide as alternative drug. The aim of this study was to isolate phorbol ester derivatives using solid phase extraction (SPE) technique to inhibit the proliferation of human immunodeficiency virus (HIV). The croton seeds were collected from IMACRI's Experimental Station. The seeds were extracted in methanol and petroleum ether, purified using cartridge C₁₈ (solid phase extraction, SPE), and eluted with their solvent. The effluents were dried by rotary-evaporator and spotted on thin layer chromatography (TLC, silica gel 60 F₂₅₄). The average of recovery test showed good results (125 and 115%) in triplicate for each extract. The contents of phorbol 13-decanoate in methanol and petroleum ether extracts were 2,500 and 115 ppm.

Key words : *Phorbol 13-decanoate analysis, Croton tiglium seed, SPE, HIV herbal medicine*

PENDAHULUAN

Tanaman kemalakuan (*Croton tiglium*) termasuk golongan famili *Euphorbiaceae*, mudah tumbuh di daerah tropis dan dalam kurun waktu enam bulan sampai satu tahun sudah berbunga (berbuah). Penyebarannya cukup luas mulai dari daerah Asia tropis ke India, ke New Guinea dan Jawa, ke bagian utara Indonesia, dan ke China (Heyne 1987).

Semua bagian tanaman kemalakuan mempunyai rasa pedas (sebagai ciri atau karakteristiknya) dan dapat menyebabkan radang dan pembengkakan di mulut, tenggorokan, dan bibir terutama asal bagian bijinya (Heyne 1987). Menurut Goel *et al.* (2007), *phorbol ester* bersifat toksik pada hewan dengan target utama pada sel membran, yaitu dengan cara menempel pada reseptor membran fosfolipid dan mengaktifasi enzim protein kinase (PKC). Hal ini akan memicu proliferasi sel sehingga terjadi peradangan dan memicu pertumbuhan sel tunas (karsinogenik). Pada kasus kematian gajah di Bengkulu (akhir tahun 2006), hasil pengamatan patologi anatominya menunjukkan pembengkakan pada rongga mulut serta pendarahan usus, ternyata isi lambungnya mengandung *phorbol 13-decanoate (phorbol ester)* yang merupakan bahan aktif tanaman *C. tiglium* (Yuningsih 2006). Toksiknya senyawa *phorbol ester* dalam biji kemalakuan tersebut, maka jumlah biji dapat digunakan sebagai ukuran dosis letal. Dosis letal untuk manusia dan kuda hanya diperlukan masing-masing 4 biji dan 15 biji (Pettit 1977). Sementara itu hasil ekstrak petroleum eter atau pengepresan biji yang dikenal dengan nama minyak kroton bersifat jauh lebih toksik dan mengan-

dung *phorbol 12 tiglate 13-decanoate (phorbol ester)* yang penggunaannya sebagai pestisida cukup efektif (Duke, 1983). Minyak kroton bersifat seperti racun insektisida nikotin sulfat (Deshmukh and Borle 1975) dan bersifat lebih efektif dari insektisida *Derris extract* (List dan Horhammer 1979).

Beberapa hasil penelitian menyebutkan bahwa *phorbol ester* atau derivatnya dalam biji kemalakuan dapat digunakan untuk pengobatan penyakit *cytopathic*, penyakit yang disebabkan oleh beberapa macam infeksi virus seperti HIV dan AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) (El-Mekawy *et al.* 2000; Nakamura 2004; Wender *et al.* 2008). Hasil penelitian dari El-Mekawy *et al.* (2000) menunjukkan, bahwa 12-*O-Acetylphorbol-13-decanoate* dan 12-*O-decanoylphorbol-13-(2-methylbutyrate)*, derivat *phorbol ester* asal ekstrak metanol biji *Croton tiglium* efektif menghambat *cytopathic effect (CPE) HIV (Human Immunodeficiency Virus)* masing-masing pada konsentrasi inhibisi 7,6 dan 7,81 ug/ml dan konsentrasi *cytotoxic* minimum 62,5 dan 31,3 ug/ml.

Penyakit AIDS disebabkan oleh virus HIV yang merupakan ancaman bagi kesehatan manusia di dunia. Setiap tahun hampir 1 juta manusia di India dan kurang lebih 10 juta manusia di dunia terinfeksi HIV (Desai *et al.* 2009). Apabila tidak ada upaya penanggulangannya di Indonesia, maka jumlah kasus HIV pada tahun 2010 akan meningkat menjadi 400.000 dengan kematian 100.000 orang (Susilawati 2009). Sementara itu upaya medik dalam menemukan obat alternatif bagi pengobatan HIV

tersebut masih terbatas. Beberapa penelitian mengenai tanaman yang dapat menghambat pertumbuhan virus HIV (yaitu kunyit, lidah buaya, sambiloto, dan meniran) diperkirakan bisa digunakan sebagai obat anti HIV (Susilawati 2009). Menurut Gambari dan Lampronti (2006), bahwa proliferasi HIV dapat dihambat dengan cara memutus mata rantai pertumbuhannya melalui beberapa tahap, yaitu *virus-cell fusion*, *virus absorption reverse transcription*, *integration*, dan *proteolytic cleavage*.

Menurut El-Mekkawy *et al.* (2000), derivat phorbol ester 12-*O*-Acetylphorbol-13-decanoate dan 12-*O*-decanoylphorbol-13-(2-methylbutyrate phorbol 13-decanoate dapat diisolasi dari ekstrak metanol biji kemalakuan. Namun demikian, uji spektroskopi derivat tersebut masih menunjukkan adanya spot ikutan, sehingga diperlukan pengembangan metode isolasinya dengan teknik SPE.

Tujuan penelitian ini adalah mengembangkan metode isolasi derivat *phorbol ester* dengan teknik SPE yang merupakan studi awal dalam pemurnian ekstrak biji kemalakuan untuk obat anti HIV.

BAHAN DAN METODE

Bahan kimia yang diperlukan yaitu petroleum eter (PE), metanol (MeOH), aseton, kloroform, eter, dan powder standar *phorbol 13-decanoate*. Bahan lainnya berupa *cartridge C₁₈*, plat kromatografi lapis tipis (KLT) Silika gel 60 F₂₅₄, dan bahan pemeriksaan biji kemalakuan diperoleh dari Kebun Percobaan Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik, Bogor (Gambar 1).



Gambar 1. Tanaman kemalakuan (*Croton tiglium*)

Figure 1. *Croton tiglium* plant

Persiapan bahan

Biji dikupas dengan hati-hati (terasa panas dan pedih) untuk mengeluarkan daging bijinya. Daging biji dihaluskan dengan menggunakan alat *blender* hingga diperoleh *powder* (serbuk) kemalakuan (PK).

Analisis phorbol 13-decanoate dalam ekstrak MeOH dan ekstrak PE

Preparasi ekstrak MeOH dan ekstrak PE

Ekstrak MeOH dan ekstrak PE dibuat dengan mencampurkan 5 g PK dengan 100 ml MeOH atau 100 ml PE, lalu dikocok selama 1 jam dengan *shaker* dan disaring. Kemudian filtratnya diuapkan dengan *rotary evaporator* sampai volume mencapai 2 ml.

Seleksi pelarut pengembang plat KLT

Larutan standar *phorbol 13-decanoate* (PD) dispot (1 ul) dengan konsentrasi 1.000 ppm pada 3 plat KLT. Masing-masing plat dikembangkan dalam campuran kloroform dan metanol (60:40), campuran PE dan eter (90:10) dan eter 100%, kemudian PD dideteksi di bawah UV dengan panjang gelombang 254 nm.

Standar PD dispot (1 ul) dengan konsentrasi 1.000 ug/ml se-

banyak 5 kali ulangan pada plat yang berbeda dan masing-masing plat dikembangkan dalam pelarut eter 100%. PD dideteksi (dengan cara seperti telah dijelaskan sebelumnya) dan dihitung nilai Rf dari PD tersebut. Ekstrak MeOH (2 ul), ekstrak PE (2 ul), dan standar PD (2 ul dengan konsentrasi 100 ug/ml) dispot sebagai pembanding pada plat, dikembangkan dalam pelarut eter 100%, dan dilakukan deteksi PD. Percobaan dilakukan dalam 3 kali ulangan.

Pemurnian ekstrak dengan cartridge C₁₈ (teknik Solid Phase Extraction, SPE)

Untuk ekstrak MeOH, *cartridge* C₁₈ dikondisikan dengan 5 ml campuran MeOH dan H₂O (1:1). Ekstrak MeOH (2 ml) dimasukkan ke dalam *cartridge* lalu dicuci dengan 2 ml H₂O dan dielus dengan 10 ml MeOH. Untuk ekstrak PE (berupa minyak), *cartridge* C₁₈ dikondisikan dengan 5 ml campuran aseton dan H₂O (1:1). Satu ml minyak dihomogenkan dengan 9 ml aseton, diambil 1 ml lalu dimasukkan ke dalam *cartridge*. *Cartridge* dicuci dengan 2 ml aseton 10%, kemudian dielus dengan 10 ml aseton. Masing-masing eluen diuapkan dan hasil residu yang terbentuk dilarutkan dengan masing-masing pelarutnya, kemudian dispot pada plat KLT, dan dilakukan deteksi PD.

Konfirmasi hasil pemurnian ekstrak

Uji perolehan kembali PD dilakukan dengan cara memasukkan 2 ml MeOH (blanko) yang telah ditambahkan 100 ug standar PD (100 ul dengan konsentrasi 1.000 ug/ml) ke dalam *cartridge* C₁₈ yang telah dikondisikan. Begitu juga untuk ekstrak PE

dengan menggunakan 1 ml minyak kelapa (blanko) yang telah ditambahkan 100 ug standar PD. Pemurnian dilakukan seperti pada sampel minyak. Kedua eluen diuapkan dan PD dideteksi untuk menentukan prosentase uji perolehan kembali. Deteksi PD dilakukan dalam kedua ekstrak MeOH dan ekstrak PE biji kemalakuan tersebut. Konfirmasi pemurnian dilakukan dalam 3 kali ulangan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengembangan metode

Pelarut pengembang plat KLT

Setelah dicoba pengembangan plat dalam 3 macam pelarut, yaitu campuran kloroform dan MeOH (60:40), campuran PE dan eter (90:10), dan eter 100%, ternyata pelarut eter 100% dapat memisahkan PD (Tabel 1) dengan nilai Rf yang hampir sama (Tabel 2). Hasil ini sesuai dengan pendapat Stahl dan Jork (1969) bahwa eter 100% salah satu dari 6 macam pelarut pengembang plat KLT yang dapat memisahkan grup *phorbol ester*.

Tabel 1. Hasil pengamatan spot standar *phorbol 13-decanoate* (KLT silika gel 60 F₂₅₄) dalam 3 macam pelarut

Table 1. Observation results on standard spot of phorbol 13-decanoate in 3 types of solvent

No. plat	Larutan pengembang/ <i>Developing solvent</i>	Hasil pengamatan spot/ <i>Spot observation result</i>
1.	Kloroform : MeOH = 60:40	tidak terjadi pemisahan
2.	Pe : E = 90:10	tidak terjadi pemisahan
3.	Eter 100%	terjadi pemisahan

Berdasarkan Tabel 2, bahwa nilai Rf hampir sama dari 5 ulangan spot dengan rata-rata simpangan 0,011. Hal tersebut memenuhi kriteria ketepatan nilai Rf yang diterima, yaitu nilai simpangan harus $\leq 0,05$ (Reich and Schibli 2008).

Tabel 2. Rata-rata nilai simpangan Rf dari 5 ulangan spot *phorbol 13-decanoate* dengan pelarut eter 100% (KLT silika gel 60 F₂₅₄)

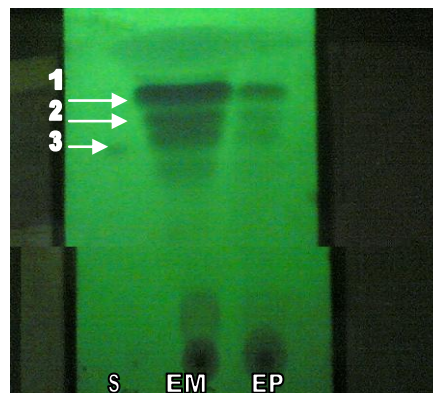
Table 2. Averaged deviation value of 5 Rf spots of *phorbol 13-decanoate* in 100% ether solvent

Ulangan spot/ Replication spot	Nilai Rf <i>phorbol 13-decanoate</i> /Rf value
1	0,777
2	0,739
3	0,753
4	0,753
5	0,739
Rata-rata Rf	0,750
Rata-rata simpangan Rf	0,011

Setelah dilakukan spot dari kedua ekstrak MeOH dan PE pada plat KLT dengan pelarut pengembang eter 100% dihasilkan 3 spot yang terdiri atas 1 spot dengan Rf sama dengan standar PD yang menunjukkan positif PD dan 2 spot lainnya yang kemungkinan berupa senyawa *phorbol ester*. Hal ini juga dikemukakan oleh El-Mekkawy *et al.* (2000), bahwa 5 *phorbol* diester bersama-sama dengan 3 *phorbol ester* dari hasil isolasi ekstrak MeOH biji *C. tiglium* dan derivat [(12-*O*-Acetyl*phorbol-13 decanoate* dan 12-*O*-decanoyl *phorbol 13-(2-methylbutyrate)*] yang dapat menghambat *cytopathic effect* (CPE) HIV pada sel MT-4 dan keaktifan protein kinase C (PKC).

Pemurnian ekstrak dengan menggunakan cartridge (teknik SPE)

Senyawa *phorbol ester* larut dalam MeOH (polar), sehingga digunakan cartridge yang non polar (cartridge C₁₈) yang telah dikondisikan. Cartridge ini akan mengikat *phorbol ester*, kemudian dilepaskan setelah dielusi dengan MeOH. Pengamatan spot pada KLT menunjukkan spot yang lebih bersih (tidak ada spot ikutan). Begitu juga pada sampel minyak, spot yang dihasilkan lebih bersih (Gambar 2) setelah minyak dijadikan polar lebih dahulu, dengan cara melarutkannya dengan aseton (polar) dan cartridge C₁₈ pada kondisi tertentu.



Gambar 2. Kromatogram KLT dari ekstrak metanol dan petroleum eter biji kemalakan

Figure 2. Thin layer chromatogram of methanol and petroleum ether extracts of *Croton tiglium* seed

Keterangan/Note :

S : spot standar/standard spot

EM : spot ekstrak MeOH/spot of MeOH extract

EP : spot ekstrak PE/spot of PE extract

Konfirmasi pemurnian dengan teknik SPE

Ketepatan metode pemurnian dengan penggunaan *cartridge* tersebut dapat dikonfirmasi dengan uji perolehan kembali yaitu penambahan standar PD ke dalam MeOH dan minyak kelapa (ekstrak PE tidak mengandung PD) sebagai blanko. Hasil uji perolehan kembali menunjukkan rata-rata 125 dan 115% dari 3 ulangan penambahan standar PD ke dalam MeOH dan minyak kelapa (Tabel 3) dan mendekati kisaran kriteria uji perolehan kembali yang dapat diterima (80-120%) (Antic *et al.* 2007).

Analisis PD dalam kedua ekstrak MeOH dan PE biji kemalakuan masing-masing 2.500 dan 115 ppm (Tabel 4). Spot yang dihasilkan cukup bersih dan terdiri atas 3 spot, yaitu spot phorbol ester (spot 1 dan 2) dan spot standar PD (spot 3) (Gambar 2).

Kandungan PD dalam ekstrak MeOH jauh lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak PE, karena sifat kepolaran PD yang sama dengan MeOH, sedangkan PE bersifat non polar. *Phorbol ester* bersifat polar karena 7 senyawa ester yang terdapat dalam biji kemalakuan tersebut terdiri dari struktur beberapa gugus OH (Seawright *et al.* 1984).

Tabel 3. Hasil uji perolehan kembali *phorbol 13-decanoate* sebagai konfirmasi pemurnian dengan teknik SPE

Table 3. Recovery results of purification confirmation test of *phorbol 13-decanoate* using SPE technique

Macam ekstrak/ <i>Extractant</i>	Konsentrasi <i>phorbol 13-decanoate</i> yang ditambahkan/ <i>Addition of 13-decanoate</i> (µg)	Hasil uji perolehan kembali (µg)/ <i>Recovery result</i> (µg)	Hasil uji perolehan kembali (%)/ <i>Recovery result</i> (%)	Rata-rata (%)/ <i>Averaged value</i> (%)
Metanol	100	125	125	125
	100	125	125	
	100	125	125	
Petroleum eter (minyak)	100	125	125	115
	100	110	110	
	100	110	110	

Tabel 4. Kadar *phorbol 13-decanoate* dalam ekstrak metanol dan petroleum eter biji kemalakuan dengan teknik SPE

Table 4. *Phorbol 13-decanoate content in methanol and PE extracts of C. tiglium seed using SPE technique*

Macam ekstrak biji kemalakuan/ <i>Type of seed extract</i>	Kadar <i>phorbol 13-decanoate</i> /Phorbol content (ppm)			
	Ulangan/ <i>Replication</i>			Rata-rata/ <i>Averaged value</i>
	1	2	3	
Metanol	2.500	2.500	2.500	2.500
Petroleum eter (PE)	110	110	125	115

Walaupun kandungan PD dalam ekstrak PE (minyak) cukup rendah tetapi dapat diperoleh dengan cara yang lebih murah (biji dipres dengan tekanan tinggi).

KESIMPULAN DAN SARAN

Metode isolasi dengan teknik SPE (*cartridge* C₁₈) memberikan hasil yang cukup baik dengan perolehan kembali *phorbol 13-decanoate* 125 dan 115% (ekstrak metanol dan ekstrak petroleum eter) dan diperoleh hasil spot yang murni (tidak ada ikutan). Kandungan *phorbol 13-decanoate* dalam ekstrak metanol dan ekstrak petroleum eter masing-masing 2.500 dan 115 ppm.

Penelitian lanjutan diperlukan untuk mendapatkan karakteristik derivat *phorbol ester 12-O-Acetylphorbol-13 decanoate* dan *12-O-decanoyl phorbol 13-(2-methylbutyrate)* hasil isolasi *phorbol 13-decanoate* dari ekstrak MeOH dan PE biji kemalakuan dengan menggunakan metode SPE sebagai studi pendahuluan untuk bahan obat anti HIV-1.

DAFTAR PUSTAKA

Antic, D., S. Filipic, and D. Agbaba. 2007. A Simple and Sensitive TLC Method for Determination of Clopidogrel and Its Impurity SR 26334 In Pharmaceutical Products. www.us.edu.pl/universytet/jednostki/wydzialy/.../acta.../17 AC18pdf [4/11/2010].

Desai, S.H., K. Majumdar, dan K.S. Kulkarni. 2009. Exploring Natural Molecules for antiviral therapy : A short Review. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology* 3(1):117-122.

Deshmukh, S.D. and M.N. Borle. 1975. Studies on The Insecticidal Properties of Indigenous Plant Products. *Indian J. Entomology* 37(1):11-18.

Duke, J.A. 1983. Euphorbiaceae. Purging Croton, Physic Nut, Croton-Oil Plant. *Handbook of Energy Crops*. http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Croton_tiglium.html [23/10/2003]

El-Mekkawy, S., M.R. Meshelhy, N. Nakamura, M. Hattori, T. Kawahata, and T. Otake. 2000. Anti HIV-1 Phorbol Ester from the Seeds of *Croton tiglium*. *Phytochemistry*. 53(4):457-464.

Gambari, R. and I. Lampronti. 2006. Inhibition of Immunodeficiency Type-1 Virus (HIV-1) Life Cycle by Medicinal Plant Extracts and Plant Derived Compounds. In M.T.H. Khan and Ather (Eds). *Lead Molecules from Natural Products*. Bangladeshi. Elsevier B.V. pp. 299-311.

Goel, G., H.P.S. Makkar, G. Fracis, and K. Becker. 2007. Phorbol Esters: Structure, Biological Activity, and Toxicity in Animals. *International Journal of Toxicology*. 26:279-288.

Heyne, K. 1987. Tumbuhan Berguna di Indonesia. Badan Litbang Kehutanan, Jakarta. hlm. 1157-1158.

List, P.H. and L. Horhammer. 1979. Hager's *Hanbuch Der Pharmazeutischen Praxis*. 1969-1979. vol. 2-6. Springer-Verlag, Berlin. http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_ene_rgy/Croton_tiglium.html [23/10/2003]

- Nakamura, N. 2004. Inhibitory Effects of Some Traditional Medicines on Proliferation of HIV-1 and Protease. *Yakugaku Zasshi*. 124(8):519-529.
- Pettit, G.R. 1977. Biosynthetic Products for Cancer Chemotherapy. Vol. 1. Plenum Press. New York. 79 p.
- Reich, E. and A. Schibli. 2008. Validation of High-performance Thin Layer Chromatographic Methods for The Identification of Botanicals In a cGMP. *Journal of AOAC International*. 91(1):13-20.
- Seawright, A.A., M.P. Hegarty, L.F. James, dan R.F. Keeler. 1984. Skin-irritant and Tumor-Promoting Compounds of Plants of The Euphorbiaceae. *Plant Toxicology Proceedings of the Australia – USA. Poisonous Plants Symposium*. Brisbane, Australia. pp. 357-366.
- Stahl, E. and H. Jork. 1969. Terpens Derivatives, Essential oils, Balsams and Resins. *Thin Layer Chromatography. A Laboratory Handbook*. Second edition. Springer Verlag. New York. 214 p.
- Susilawati, D. 2009. Lumpuhkan HIV dengan Herbal Mungkinkah?. Pusat Keunggulan IPTEK Perkebunan. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan. <http://perkebunan.litbang.deptan.go.id/?p=berita.5.107> [8/7/2009].
- Wender, P.A., J.M. Kee, and J. Warrington. 2008. Synthesis Boost for HIV Research. <http://www.rsc.org/chemistryworld/News/2008/Ma/02050801.asp> [27/07/2010].
- Yuningsih. 2006. Laporan Hasil Pemeriksaan Sampel Diagnostik. Balai Besar Penelitian Veteriner (tidak dipublikasi).