

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara tropis yang kaya dengan keanekaragaman hayati, khususnya dalam hal tanaman obat. Dari sekitar 40.000 spesies tumbuhan yang ada di dunia, 30.000 di antaranya tumbuh di Indonesia, dengan 26% sudah berhasil dibudidayakan (Purwanto, 2016). Tanaman-tanaman ini, baik yang telah dibudidayakan maupun yang masih tumbuh liar, memiliki peranan penting dalam tradisi pengobatan herbal di Indonesia. Berbagai jenis tanaman obat digunakan secara empiris oleh masyarakat, terutama untuk pengobatan penyakit-penyakit dengan khasiat yang telah terbukti secara turun-temurun (Grenvilco *et al.*, 2023).

Kebutuhan akan obat-obatan baru terus meningkat seiring dengan semakin kompleksnya penyakit yang dihadapi masyarakat. Namun, pengembangan obat yang sepenuhnya bergantung pada teknologi modern tampaknya telah mencapai batas tertentu. Sejak tahun 1980-an, industri farmasi mulai mengembangkan teknik pembuatan senyawa dalam jumlah besar secara cepat dan mencoba menggabungkan berbagai jenis bahan kimia untuk menghasilkan obat baru. Namun, meskipun upaya ini dilakukan secara besar-besaran, hasil yang diperoleh belum mampu memenuhi harapan dalam meningkatkan jumlah obat yang diproduksi. Beberapa perusahaan farmasi bahkan menghadapi tantangan besar dalam mengembangkan produk baru. Hal ini menunjukkan bahwa diperlukan pendekatan lain untuk memenuhi kebutuhan masyarakat akan obat-obatan baru yang efektif dan aman (Yuan *et al.*, 2016). Dalam beberapa tahun terakhir, perhatian terhadap produk alami semakin meningkat sebagai alternatif yang potensial dalam pengembangan obat baru (Atanasov *et al.*, 2021). Produk alami yang telah berevolusi selama jutaan tahun memiliki keragaman kimia yang unik, yang menghasilkan beragam aktivitas biologis dan sifat farmakologi yang mirip dengan obat. Oleh karena itu, produk alami menjadi salah satu sumber utama dalam mengembangkan senyawa awal dan struktur dasar untuk obat-obatan baru (Chaachouay & Zidane, 2024).

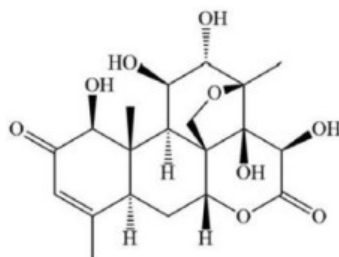
Salah satu sumber senyawa bahan alam yang menjanjikan untuk pengembangan obat adalah tanaman buah makasar (*Brucea javanica* (L.) Merr.). Tanaman buah makasar merupakan salah satu jenis tanaman herbal yang telah digunakan secara turun temurun untuk mengobati berbagai penyakit, seperti sakit pinggang, nyeri, panas dalam, dan luka (Hamdani *et al.*, 2018). Buah makasar mengandung senyawa golongan alkaloid, quassinoid (bruceantin, bruceantanol, brusatol, bruceine), polifenol, tannin, dan minyak atsiri. Selain itu, buah makassar juga mengandung asam oleat, asam linoleat, asam stearat, dan asam palmitoleat (Hamdani *et al.*, 2018). Dalam pengobatan modern, para peneliti menemukan bahwa senyawa quassinoid dalam tanaman buah makasar

kologi sebagai bahan obat antikanker dan antiproliferasi, terutama bruceine-D (Li *et al.*, 2021).

h banyak diteliti karena manfaatnya dalam bidang pengobatan, antikanker. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa bruceine-D menghambat pertumbuhan berbagai jenis sel kanker, termasuk kanker paru, hati, pankreas. bruceine-D bekerja dengan cara memicu kematian sel dengan mengganggu jalur sinyal dalam sel yang berperan dalam



pembelahan dan kelangsungan hidup sel kanker. Dengan berbagai efek biologis tersebut, bruceine-D memiliki prospek sebagai bahan baku alami untuk pengembangan obat kanker (Tan *et al.*, 2019; Xiao *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2016; Lau *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2012).



Gambar 1. Struktur senyawa bruceine-D (Fan *et al.*, 2020)

Bruceine-D pada dosis 1 mg/Kg BB telah dilaporkan memiliki kemampuan menurunkan kadar glukosa darah yang terpantau lebih efektif dibandingkan dengan glibenklamid pada dosis 3 mg/Kg BB (Noorshahida *et al.*, 2009). Selain itu, bruceine-D memiliki aktivitas sitotoksik terhadap berbagai sel kanker, seperti leukemia, melalui mekanisme penghambatan Nrf2 dan aktivasi NF- κ B, yang menjadikan buah makasar sebagai tanaman potensial untuk penelitian lebih lanjut, terutama dalam pemanfaatan senyawa quassinoid dari bagian non-minyak biji buah makasar yang sering terbuang (Ye *et al.*, 2015). Bruceine-D dapat diperoleh dari berbagai bagian tanaman buah makasar, termasuk daun, buah, biji, batang, dan akar. Penelitian menunjukkan bahwa bagian yang paling banyak menghasilkan bruceine-D adalah biji. Hal ini disebabkan karena biji buah makasar memiliki kandungan quassinoid, termasuk di dalamnya bruceine-D, yang lebih tinggi dibandingkan bagian tanaman lainnya (Mulasari *et al.*, 2019).

Beberapa peneliti sebelumnya telah melakukan isolasi senyawa bruceine-D dari biji buah makasar. Subeki *et al.* (2007) menggunakan metode ekstraksi air panas, diikuti dengan partisi menggunakan etil asetat (EtOAc) dan pemisahan senyawa melalui kromatografi kolom silika. Dari 1 kg simplisia biji buah makasar, diperoleh 159 mg bruceine-D dari fraksi MeOH-CHCl₃ (7:3). Meskipun berhasil menghasilkan jumlah isolat yang cukup tinggi, metode ini memiliki kelemahan berupa proses yang panjang dan kompleks, serta penggunaan pelarut dalam jumlah besar. Penelitian lain oleh Mao *et al.* (2019) menggunakan metode ekstraksi konvensional berupa maserasi dengan etanol 96%. Metode ini membutuhkan jumlah sampel yang sangat besar, yaitu 25 kg biji buah makasar, namun hanya menghasilkan 20 mg bruceine-D. Hal ini menunjukkan efisiensi yang sangat rendah, disertai dengan waktu ekstraksi yang lama dan konsumsi pelarut yang tinggi. Qijian *et al.* (2012) mengembangkan metode refluks dan pemurnian bertingkat menggunakan resin makropori serta kromatografi silika gel, menghasilkan 78 mg dari 1 kg biji. Namun, prosedur ini tetap kompleks dan memakan



an beberapa kelemahan metode yang telah ada, penelitian ini mengembangkan metode ekstraksi dan isolasi bruceine-D yang lebih cepat untuk isolasi bruceine-D dari biji buah makasar.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana cara ekstraksi dan isolasi senyawa bruceine-D dari biji buah makasar (*Brucea javanica* (L.) Merr.)?
2. Bagaimana karakteristik struktur senyawa bruceine-D yang diisolasi dari biji buah makasar jika dianalisis menggunakan spektroskopi ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengisolasi senyawa bruceine-D dari biji buah makasar (*Brucea javanica* (L.) Merr.).
2. Melakukan karakterisasi struktur senyawa bruceine-D yang diisolasi dari biji buah makasar menggunakan analisis ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR untuk memastikan identitas dan kemurnian senyawa.



BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah alat soxhlet Iwaki®, blender, desikator, KLT silika gel 60 F254, kolom vakum Duran®, lampu UV 254 dan 366 nm, *magnetic stirrer* Joanlab®, *mantel heater* Gopal®, *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) Avance Neo® 700 MHz, oven, pipa kapiler Nesco®, pompa vakum, *rotary evaporator* Heidolph®, *sentrifuge* Oregon®, timbangan analitik, dan *waterbath* Memmert®.

Bahan yang digunakan adalah simplisia biji buah makasar (*Brucea javanica* (L.) Merr.) yang diperoleh dari *supplier* Tangerang Selatan, Indonesia. *Aquadest*, etanol 96%, etil asetat, kloroform, metanol, n-heksan, petroleum eter, dan baku standar bruceine-D.

2.2 Metode Penelitian

2.2.1 Penyiapan sampel

Dilakukan determinasi terhadap tanaman buah makasar di laboratorium botani farmasi, fakultas farmasi, Universitas Hasanuddin. Disiapkan simplisia kering biji buah makasar sebanyak 1 Kg yang diperoleh dari *supplier* daerah Tangerang Selatan. Simplisia dihaluskan, hingga diperoleh serbuk setengah halus. Simplisia kemudian disimpan pada plastik *ziplock* dan ditambahkan silika gel.

2.2.2 Proses penghilangan lemak dan ekstraksi simplisia

Serbuk simplisia dibebas-lemakkan dengan petroleum eter menggunakan metode sokletasi, hingga diperoleh ekstrak cair yang kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 56°C. Sampel yang telah dibebas lemakkan kemudian diekstraksi dengan etanol 96% menggunakan metode sokletasi sebanyak 8 sampai 10 siklus. Ekstrak cair yang diperoleh dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*.

2.2.3 Partisi cair-padat

Ekstrak kental yang diperoleh dipartisi dengan metode ekstraksi cair-padat menggunakan *magnetic stirrer*. Ekstrak dipartisi menggunakan pelarut n-heksan secara berulang-ulang hingga diperoleh ekstrak larut n-heksan dan tidak larut n-heksan. Ekstrak tidak larut n-heksan kemudian dipartisi dengan pelarut kloroform, hingga diperoleh ekstrak larut kloroform dan ekstrak tidak larut kloroform, dengan *centrifuge* pada 3000 rpm selama 10 menit.

2.2.4 Kromatografi cair vakum

Pemisahan senyawa dilakukan menggunakan kromatografi kolom dengan sistem elusi gradien (*increasing polarity*). Ekstrak tidak larut kloroform dipreparasi untuk kromatografi ditimbang dengan perbandingan (1:10) dan elusi dimulai dengan kemudian kepolaran meningkat dengan penambahan metanol (Mao



Tabel 1. Rasio eluen yang digunakan untuk isolasi

Ket.	Jenis eluen	Rasio (%)
A	CHCl ₃	100
B	CHCl ₃ :MeOH	95:5
C	CHCl ₃ :MeOH	90:10
D	CHCl ₃ :MeOH	80:20
E	CHCl ₃ :MeOH	70:30
F	MeOH	100
G	EtOH	100

2.2.6 KLT preparatif dan pemurnian senyawa

KLT preparatif dilakukan dengan menggunakan silika gel 60 F254 sebagai fase stationer dengan campuran kloroform:metanol (9:1) v/v, dipilih fraksi yang mengandung senyawa target (bruceine-D), kemudian dilarutkan menggunakan metanol dan ditotolkan secara kontinyu pada plat KLT hingga membentuk pita horizontal kemudian dielusi pada chamber yang berisi fase gerak. Hasil diamati di bawah lampu UV 254 nm, dan pita senyawa ditandai. Silika yang mengandung senyawa dikeruk dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer. Dilakukan penambahan pelarut kloroform:metanol (1:1) v/v, lalu di-*stirrer*, hasil kemudian disaring untuk memisahkan senyawa dan silika menggunakan kolom yang dibantu dengan vakum. Isolat yang diperoleh kemudian disimpan pada cawan porselen, dan diuapkan pada suhu ruang hingga diperoleh kristal bruceine-D.

2.2.5 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis menggunakan silika gel 60 f254 *precoated aluminium plate*, dengan ketebalan 0,2 mm sebagai fase stationer. Fase gerak yang digunakan yaitu campuran kloroform:metanol (9:1) v/v, dan etil asetat:metanol:air (13:1:0,5). Visualisasi dilakukan dengan penyemprotan asam sulfat 10% dan pemanasan hingga diperoleh spot yang sesuai dengan nilai Rf pembanding. Nilai Rf dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh noda}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}} \quad (\text{Usman \& Muin, 2023})$$

2.2.7 Kristalisasi senyawa

Kristalisasi isolat Bruceine-D dilakukan dengan menggunakan metanol sebagai pelarut. Larutan dipanaskan selama beberapa menit hingga senyawa larut sempurna. Setelah itu, dilakukan pendinginan secara spontan dengan bantuan es batu untuk membentuk kristal.

2.2.8 Karakterisasi senyawa

Karakterisasi Bruceine-D dilakukan dengan menggunakan spektroskopi ¹H-NMR dan ¹³C-NMR dengan CD₃OD sebagai pelarut pada analisis ini, kemudian dianalisis dengan NMR AVANCE NEO®, 700 MHz. Isolat bruceine-D dianalisis dengan ¹H-NMR dan ¹³C-NMR dengan CD₃OD sebagai pelarut, dan data yang diperoleh dibandingkan dengan data pada referensi (Mao *et al.*, 2019; Dou *et al.*, 2018).

