

BIOTRANSFORMASI KURKUMIN MELALUI KULTUR SUSPENSI SEL DAUN *Catharanthus roseus* [L] G. Don BERBUNGA MERAH

BIOTRANSFORMATION CURCUMA THROUGH THE CULTURE OF SUSPENS LEAF CELL *Catharanthus roseus* [L] G. Don BLOOMY SQUEEZE

Azis Saifudin*, Suparti**, Anang Fuad*, Muhammad Da'i*

* Fakultas Farmasi

** Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan

Universitas Muhammadiyah Surakarta

Jln. A. Yani, Tromol Pos I, Pabelan Kartasura, Surakarta 57102

ABSTRAK

Kurkumin dikenal sebagai bahan alam yang memiliki aktivitas biologis dengan spektrum luas, seperti: anti-oksidan, anti-inflamasi, anti-kanker dan anti-mutagen. Kurkumin merupakan senyawa non polar yang sulit larut dalam air sehingga menimbulkan kesulitan pada formulasi dan aplikasi kliniknya. Untuk mengatasi permasalahan tersebut maka dipergunakan metode biotransformasi. Peneliti ingin mengetahui apakah kalus yang berasal dan eksplan daun *C. roseus* bunga merah mampu melakukan biotransformasi kurkumin. Hasil KLT diperoleh adanya senyawa baru dalam biomasa suspensi sel yang telah ditambahkan kurkumin dengan warna oranye hampir sama dengan kontrol kurkumin standar dengan harga Rf yang lebih rendah. Setelah dilakukan hidrolisis dan diuji KLT ternyata senyawa baru tersebut positif mengandung kurkumin dan glikosida. Hasil pembacaan Spektroskopi IR kedua senyawa tersebut diperoleh senyawa tersebut mengandung gugus OH, eter, gugus karbonil, cincin aromatik dan CH alifatik sehingga dapat disimpulkan bahwa kedua senyawa mengandung gugus glikosida kurkumin. Berdasarkan hasil uji KLT dan Spektroskopi dapat disimpulkan bahwa kultur suspensi sel daun *C. roseus* bunga merah mampu melakukan biotransformasi kurkumin menjadi glikosida kurkumin.

Kata kunci : kurkumin, biotransformasi, *Catharanthus roseus*, eksplan, KLT, dan glikosida kurkumin

ABSTRACT

Curcuma known by a nature materials owning activity biologic with the wide of spectrum, like: anti-oxidants, anti-inflames, anti-cancer and anti-montage. Curcuma represent the compound is dissolve difficult in water (non-polar) causing difficulty of formulation and its clinic application. To overcome the problems hence utilized by method biotransformation. Researcher wish to know what callous coming from explants leaf *C. red roseus* flower can conduct the biotransformation curcuma. Result KLT obtained by the existence of new compound in biomass suspension cell which have been enhanced by curcuma with the orange color of much the same lo with the control of curcuma standard at the price of lower Rf. After done by a hydrolysis and tested by the TLC in the reality the new compound positive contain the curcuma and glycoside. Result of second Spectroscopy IR read of the compound obtained by the compound contain the bunch OH, ether, bunch carbonyl, ring of inferential aliphatic aromatics and CH so that second compound contain the bunch of glycoside curcuma. Pursuant to result test the inferential TLC Spectroscopy and that culture of suspension of leaf cell *C. red roseus* flower can do the biotransformasi curcuma become the glycoside curcuma.

Keywords : *Curcuma, biotransformasi, Catharanthus roseus, explants, TLC, and glycoside curcuma*

PENDAHULUAN

Kurkumin [1,7-bis- (4'-hidroksi-3'-metoksifenil) - 1,6 - heptadiena -3,5-dion] dikenal sebagai bahan alam yang memiliki aktivitas biologis dengan spektrum luas, seperti: anti-oksidan, anti-inflamasi, anti-kanker dan anti-mutagen. Kurkumin dapat diperoleh dari rhizoma tanaman jenis kurkuma berupa zat warna kuning. Oleh penduduk Asia, utamanya India dan Indonesia, kurkumin ini sering digunakan sebagai bahan tambahan makanan, bumbu atau obat-obatan, dan tidak menimbulkan efek toksik (Meiyanto, 1999).

Kurkumin merupakan senyawa non polar yang sulit larut dalam air sehingga menimbulkan kesulitan pada formulasi dan aplikasi kliniknya (Kaminaga, et al, 2003). Untuk mengatasi permasalahan tersebut maka dipergunakan metode biotransformasi. Biotransformasi dipilih karena reaksinya bersifat enzimatik sehingga reaksi biotransformasi selektif dan sangat spesifik dalam mengubah substrat yang ada. Spesifitas dan selektivitas ini disebabkan oleh struktur kiral

protein enzim. Apabila ada beberapa gugus fungsi maka hanya posisi spesifik tertentu yang dipengaruhi. Reaksi biotransformasi dapat digunakan untuk menyerang gugus fungsi yang tidak dapat diaktifkan secara efisien atau memerlukan beberapa tahap antara sebelum dapat bereaksi secara kimia (Indrayanto, 1998).

Salah satu reaksi biotransformasi yang menarik adalah konjugasi glikosil. Konjugasi glikosil merupakan reaksi pengikatan gula dengan suatu senyawa organik.

Reaksi konjugasi glikosil merupakan reaksi biotransformasi yang karakteristik dan kultur sel tanaman dan mempunyai potensi untuk diaplikasikan dalam industri sebagai biokatalis (Indrayanto, 1998).

Senyawa organik yang berubah strukturnya ke bentuk glikosida, maka senyawa tersebut akan mengalami perubahan sifat fisika kimia dengan aktivitas biologi yang berbeda, di mana senyawa tersebut akan lebih polar sehingga diharapkan bila masuk ke dalam tubuh secara per-oral maka senyawa tersebut akan lebih cepat diabsorpsi. Dengan demikian akan diperoleh nilai tambah dibandingkan senyawa semula, sebagaimana beberapa penelitian dibawah ini:

Kaminaga et al., (2003) melaporkan bahwa kurkumin glukosida yang diperoleh melalui kultur suspensi sel tanaman tapak dara (*Catharanthus roseus*) mempunyai kelarutan dalam air 20 juta kali dan kurkumin semula.

Umetami et al., (1982) melaporkan biokonversi asam salisilat menjadi Oglukosida dengan kultur suspensi sel *Mallotus japonicus*, ternyata glikosida salisilat pada percobaan mencit memberikan efek analgesik yang lebih cepat dan lebih lama dibandingkan asam salisilat.

Penelitian Kaminaga (2003) tidak menyatakan *C. roseus* varietas dan bunga merah, putih, atau violet yang mampu melakukan glikosilasi terhadap senyawa kurkumin. Jika diketahui varietas yang mampu melakukan glikosilasi maka sangat besar manfaatnya untuk melakukan glikosilasi senyawa turunan dan analog dari kurkumin. Peneliti ingin mengetahui apakah kalus yang berasal dari eksplan daun *C. roseus* bunga merah mampu melakukan biotransformasi kurkumin.

METODE PENELITIAN

Alat

Timbangan analitik, pH meter, pengaduk magnetik dengan pemanas, botol kultur, mikro pipet dan pipet volum dengan berbagai ukuran, serta alat-alat gelas (Pyrex), oven, autoklaf, botol semprot, pinset, lampu spiritus, cawan petri, skalpel, mata pisau skalpel, erlenmeyer, batang pengaduk, gelas ukur, dan gelas dengan penutup, *shaker*, sonifikator, IR Shimadzu FTIR-8201PC.

Bahan Penelitian

Daun dari tanaman tapak dara bunga merah, akuades, HCl 0.1N, NaOH 0.1N, dan senyawa-senyawa yang termasuk dalam komposisi media B5 dan LS, Sunklin, etanol 70 %, detergen So-klin, methanoi teknis, silica gel GF 254, n-butanol, asam asetat, kalium permanganat, kurkumin, senyawa hasil biotransformasi.

Prosedur penelitian

Media yang digunakan adalah media B5 dengan zat pengatw tumbuh kinetin: 2.4D (O.I : 3 ppm) dan media LS dengan zat pengatur tumbuh (kinetin dan 2.4D) 1µM. Sebanyak 100 (il kurkumin konsentrasi 150 mM ditambahkan pada media suspensi sel 10 hari setelah subkultur dan diinkubasi selama 48 jam dalam tempat gelap pada suhu ruang 25°C dalam *rotatory shaker* dengan berkecepatan 120 rpm. Biomasa hasil kultur suspensi sel kemudian dianalisis secara KLT dan Spektroskopi IR

HASIL DAN PEMBAHASAN

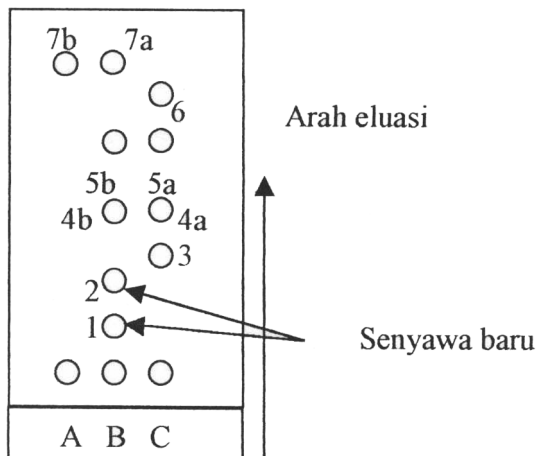
Hasil KLT

1. Analisis Senyawa baru hasil bitransformasi kurkumin

Dari hasil uji KLT diperoleh hasil yang ditunjukkan pada tabel dan gambar di bawah ini.

Tabel 1. Hasil KLT Senyawa Biotransformasi Kurkumin

Bercak	RF	Deteksi uv 366
1	0,346	Kuning
2	0,466	Kuning
3	0,506	Biru
4a	0,606	Biru
4b	0,600	Biru
5a	0,666	Biru
5b	0,680	Biru
6	0,746	Biru
7a	0,893	Oranye
7b	0,893	Oranye



Gambar 1. Kromatogram Hasil KLT Senyawa Produk

Keterangan:

- A : Kurkumin sebagai kontrol positif
- B : Ekstrak hasil biomasa suspensi sel yang telah ditambah kurkumin
- C : Ekstrak hasil biomasa suspensi sel tanpa penambahan kurkumin sebagai kontrol negatif

Dari hasil tersebut terlihat adanya senyawa baru dalam biomasa suspensi sel yang telah ditambahkan dengan kurkumin (senyawa B), senyawa baru tersebut terlihat pada bercak no.1 dan no.2 dengan warna oranye (hampir sama dengan kontrol positif tetapi berbeda dengan kontrol negatif) dan juga mempunyai harga Rf yang berbeda dari senyawa kontrol. Harga Rf senyawa baru tersebut adalah lebih rendah dari harga Rf kurkumin. Kemungkinan senyawa tersebut adalah glikosida kurkumin.

Glikosida bersifat polar, jika kurkumin terikat dalam ikatan glikosida lalu dieluasi dalam fase gerak semi polar ($B:A:W=5:1:4$) dan dengan fase diam yang bersifat polar (silika gel Gf 254 nm) maka senyawa tersebut akan cenderung terikat dengan fase diamnya dan kurang tereluasi sehingga bercaknya berada di bawah dari senyawa yang lebih non polar (kurkumin).

Bercak senyawa 1 dan 2 mempunyai harga Rf yang berbeda, jika senyawa tersebut adalah sama yaitu suatu glikosida kurkumin maka hal itu disebabkan karena adanya perbedaan jumlah gugus gula yang terikat pada senyawa kurkumin tersebut. Jika dalam suatu senyawa terdapat banyak ikatan glikosidanya maka senyawa tersebut cenderung bersifat lebih polar, sehingga dapat disimpulkan

senyawa yang berada paling bawah dekat dengan tempat penotolan adalah glikosida kurkumin yang paling banyak berikatan dengan gugus gula sedangkan bercak yang berada di atasnya adalah glikosida kurkumin yang ikatan gugus gulanya lebih sedikit.

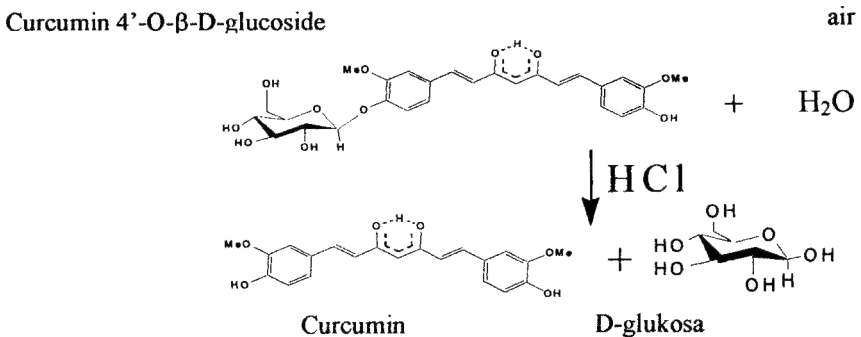
2. Pengumpulan Produk dengan KLT Preparatif

Hasil dari uji identifikasi glikosida melalui kromatografi lapis tipis menunjukkan adanya bercak tambahan dengan R_f yang lebih rendah dari pembandingan kurkumin standar dan berwarna kuning. Bercak tersebut juga warnanya berbeda dari senyawa tanpa perlakuan.

Pengujian selanjutnya menggunakan KLT preparatif dengan cara kerja yang sama seperti kromatografi lapis tipis, hanya saja pada KLT preparatif cara menotolkannya memanjang dengan jumlah penotolan sebanyak 20 kali penotolan, untuk mendapatkan hasil kerokan yang banyak. Pada penelitian ini pengerokan bercak pada pelat KLT preparatif hanya dilakukan pada bercak yang tampak secara visual saja.

Ikatan glikosida dapat diputus ikatannya oleh reaksi hidrolisis. Untuk hidrolisis kimia gula yang lebih rumit dilakukan dengan memanaskan larutan dengan air dan sedikit asam (Wilbraham *and* Matta, 1992). Dengan demikian untuk memastikan dugaan senyawa tersebut adalah suatu glikosida kurkumin dapat dilakukan dengan menghidrolisis senyawa tersebut lalu dilanjutkan dengan menganalisis adanya senyawa kurkumin dan gugus glikosida dalam senyawa tersebut.

Mekanisme reaksi:

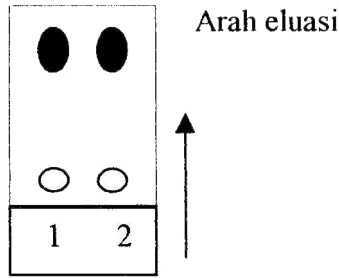


Gambar 2. Mekanisme reaksi hidrolisis glukosida kurkumin

3. Analisis Adanya Kurkumin dan Gugus Glikosida dalam Senyawa Baru

a. Analisis adanya kurkumin

Dari hasil uji KLT kedua senyawa baru yang terlihat pada bercak nomor satu dan dua pada gambar Kromatogram KLT hasil senyawa produk yang telah dihidrolisis, diperoleh hasil seperti pada tabel dan gambar di bawah ini.



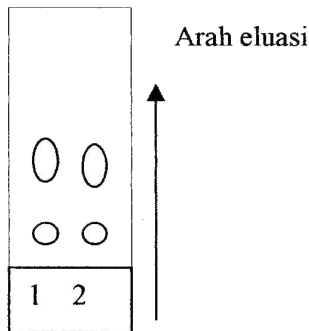
Gambar 3. Kromatogram Senyawa Produk Setelah Dihidrolisis

Keterangan

1. kurkumin (kontrol) dengan R_f 0.893.
2. senyawa hasil hidrolisis dengan R_f 0.893.
(bercak yang diperoleh bewarna kuning)

b. Analisis gugus glikosida dalam senyawa baru tersebut

Hasil uji KLT senyawa baru yang terlihat pada bercak nomor satu dan dua pada gambar Kromatogram KLT hasil senyawa produk yang telah dihidrolisis, diperoleh hasil seperti pada tabel dan gambar dibawah ini.



Gambar 4. Kromatogram Senyawa Produk Setelah Dihidrolisis dan Disemprot dengan $KMnO_4$

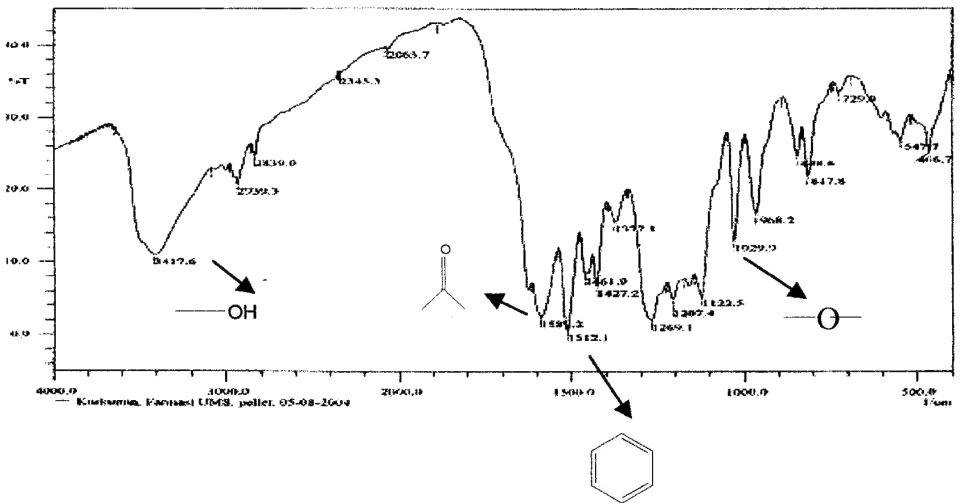
Keterangan

1. sukrosa (kontrol) dengan warna putih.
2. senyawa hasil hidrolisis dengan warna putih.
(bercak yang diperoleh setelah disemprot KMnO_4 berwarna putih)

Senyawa dikatakan sama atau identik jika senyawa tersebut mempunyai harga R_f dan disertai dengan warna bercak yang sama pula. Dari hasil analisis kurkumin dan glikosida dalam senyawa tersebut mempunyai harga R_f dan warna bercak yang sama dengan kontrol yang digunakan. Jadi dapat disimpulkan bahwa dalam senyawa produk tersebut terdapat gugus glikosida dan kurkumin dalam stuktur molekulnya.

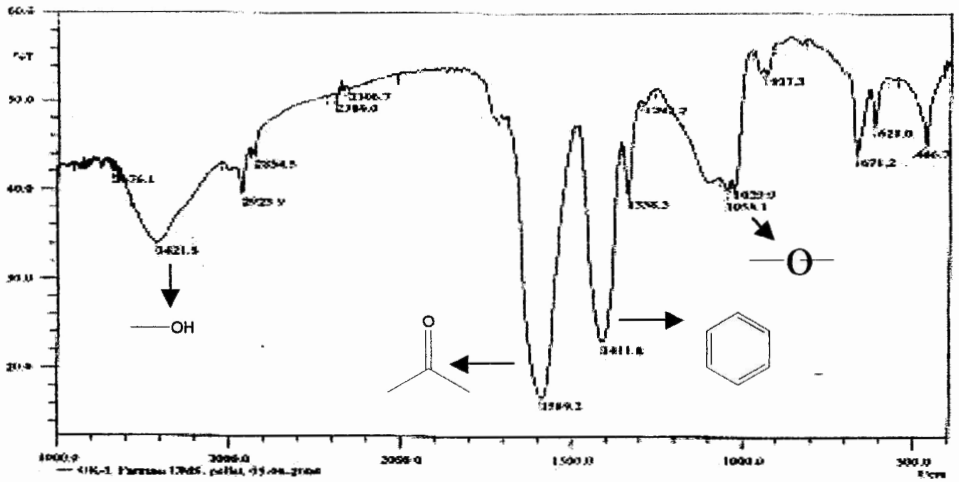
Hasil Spektroskopi IR

1. Data spektroskopi kurkumin



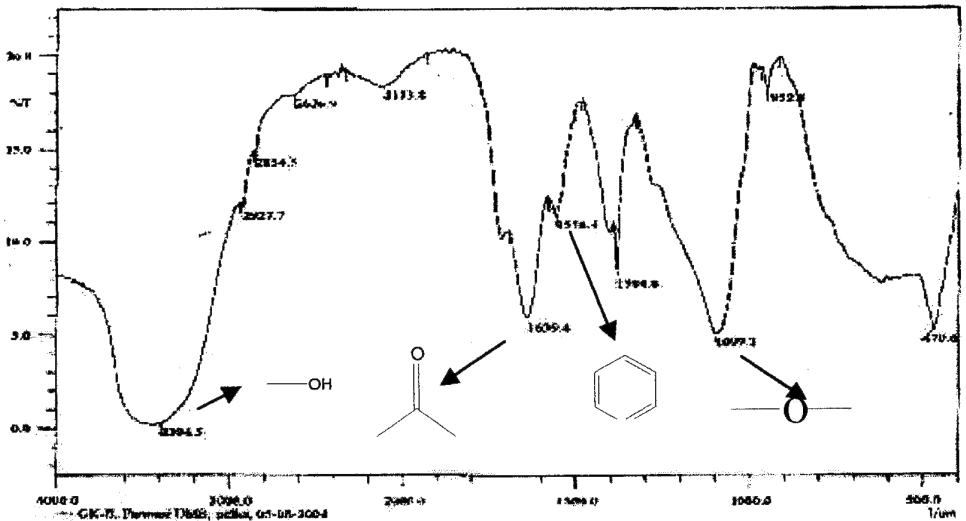
Gambar 5. Spektroskopi Kurkumin

2. Data spektroskopi senyawa pertama (senyawa pada bercak no.2)







Gambar 6. Spektroskopi Senyawa Pertama (senyawa pada bercak no.2)

3. Data spektroskopi senyawa kedua (senyawa pada bercak no.1)



Gambar 7. Spektroskopi Senyawa Kedua (senyawa pada bercak no.1)

Tabel 2. Hasil Spektroskopi IR

Gugus	Kurkumin	Senyawa 1	Senyawa 2
	1029,9	1029,9 & 1053,4	1099,3
	3417,6	3421,5	3394,5
	1589,2	1589,2	1639,4
	1461,9	1411,8	1558,4

Pita dengan absorpsi sangat lebar pada puncak 3394,5 menunjukkan adanya gugus OH, sedaiigkan pita kuat pada 1099,3 yang menunjukkan adanya gugus C-O (eter alifatik). Terdapat pula gugus karbonil yang ditunjukkan oleh pita dengan absorpsi kuat pada 1639,4 sedangkan pita lemah pada 2927,7 menunjukkan adanya C-H alifatik.

Bertolak dari kenyataati bahwa tidak mungkin dua senyawa memberikan serapan fundamental radiasi IR yang sama serta tidak mungkin dua senyawa (kecuali isomer optik) memberikan spektra IR yang sama, maka spektrofotometri IR khususnya dipakai untuk tujuan analisis kualitatif yang difokuskan pada identifikasi gugus fungsi (Mulja dan Suharman, 1995).

Ikatan glikosida adalah ikatan eter di antara hidroksil gula dengan alkohol (Wilbraham and Matta, 1992). Jadi dengan adanya gugus eter, dan alkohol dapat dijadikan sebagai petunjuk adanya ikatan glikosida. Dari hasil pembacaan senyawa pertama dan kedua tampak adanya gugus eter, dan alkohol. Gugus hidroksi (OH) pada senyawa kedua adalah lebih banyak dari senyawa pertama, hal ini ditunjukkan dengan pita yang terbentuk lebih lebar dari senyawa pertama. Perbedaan jumlah gugus OH ini disebabkan karena jumlah ikatan glikosidanya. Jika glikosida yang terikat pada senyawa tersebut lebih banyak maka secara teori jumlah gugus OH-nya pun akan lebih banyak. Jadi dengan hasil hasil spektra yang demikian dapat disimpulkan bahwa senyawa pertama ikatan glikosidanya lebih sedikit dari pada senyawa kedua.

SIMPULAN

Berdasarkan dari hasil uji KLT dan Spektroskopi dapat disimpulkan bahwa:

1. Kultur suspensi sel daun *Catharanthus roseus* berbunga merah mampu melakukan biotransformasi kurkumin.
2. Senyawa hasil biotransformasi kurkumin juga merupakan glikosida kurkumin.

DAFTAR PUSTAKA

- Indrayanto, G. 1998. *Biotransformasi Asam Orto, Meta dan Para Amino Benzoat dengan Kultur Suspensi Sel Solanum mammosum dan Solarium laciniatum*, Laporan Riset Unggulan Terpadu VI.1 (1998/1999). Surabaya: Lembaga Penelitian Universtas Airlangga.
- Kaminaga, Y., Nagatsu, A., Akiyama, T., Sugimoto, N., Yamazaki, T., Maitani, T., Mizukami, H. 2003. *Production of Unnatural Glukosides of Curcumin With Drastically Enhanced Water Solubility by Cell Suspension Cultures of Catharanthus roseus*, *FEBS Letters* 555.
- Meiyanto, E. 1999. Kurkumin Sebagai Obat Anti Kanker: Menelusuri Mekanisme Aksinya, *Majalah Farmasi Indonesia*.
- Mulya, M. Suharman. 1995. *Analisis Instrumental*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Umetami, Y., Taiiaka, S., Tanaba, M. 1982. Glucosylation of extrinsic compounds by various plant cell culture, in: Fujiwara, A. (Ed) *Plant tissue culture* 1982. Proc. 5 th Intl. *Plant tissue cell culture*, Maruzen-Tokyo., 382-384
cit Indrayanto, G., 1988, *Biotransformasi Asam Orto, Meta dan Para Amino Benzoat dengan Kultur Suspensi Sel Solanum mammosum dan Solanum laciniatum*, Laporan Riset Unggulan Terpadu VII (1998/1999). Surabaya: Lembaga Penelitian Universtas Airlangga.
- Wilbraham, C. Antony & Matta, M. 1992. *Pengantar Kimia Organik dan Hayati*, diterjemahkan Achmadi S. Bandung: ITB.