

Modul Kimia Medisinal
(Penemuan obat dari bahan alam)



Disusun oleh
Ari Satia Nugraha SF., GDipSC, MSc-res, PhD., Apt

Bagian Kimia Farmasi
Fakultas Farmasi Universitas Jember
2016

Kata pengantar

Alhamdulillah modul kimia medisinal dengan sub topik penemuan obat dari bahan alam selesai ditulis. Modul ini sejalan dengan semangat Kemetrian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi Indonesia dalam menyediakan bacaan ilmu pengetahuan dalam bahasa Indonesia. Modul ini bersama modul modul yang lain dalam mata kuliah kimia medisinal, merupakan program penerjemahan buku acuan Kimia Medisinal yang diberikan di Fakultas Farmasi - Universitas Jember, yaitu *Medicinal Chemistry* karya *Gareth Thomas* dan diharapkan menjadi sarana bagi mahasiswa untuk lebih mudah memahami isi dari buku kimia medisinal tersebut.

Modul ini bukan merupakan modul yang kaku, dimana kritik dan saran untuk pengembangan yang lebih baik sangat diperlukan

Jember, Februari 2016

Ari Satia Nugraha, PhD., Apt

Kata pengantar	ii
Daftar isi.....	iii
1. Pendahuluan.....	1
2. Uji bioaktivitas	5
2.1. Uji skrining	5
2.2. Uji monitoring.....	10
3. Dereplikasi.....	13
4. Elusidasi struktur.....	16
5. Pengembangan senyawa aktif.....	16
6. Ekstraksi.....	18
7. Fraksinasi	24
8. Contoh sejarah penemuan obat dari bahan alam (Taxol).....	29
9. Tugas dan diskusi.....	32
10. Rangkuman	33
11. Rujukan pengayaan	34
12. Latihan soal	35

Kimia medisinal

A. Capaian Pembelajaran (LO) prodi

Mampu menerapkan ilmu dan teknologi kefarmasian dalam perancangan, pembuatan dan penjaminan mutu sediaan farmasi.

B. Capaian pembelajaran (LO) MK

Memahami kimia medisinal dalam rangka mendukung penemuan dan pengembangan obat dari bahan alam.

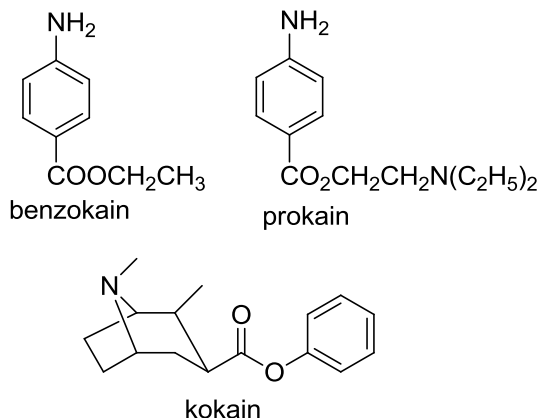
C. Kompetensi yang diharapkan

1. Mahasiswa mampu mendeskripsikan proses dan tahapan penemuan obat dari bahan alam
2. Mahasiswa mampu mengenali dan membedakan berbagai metode yang digunakan dalam penemuan obat dari bahan alam

1. Pendahuluan

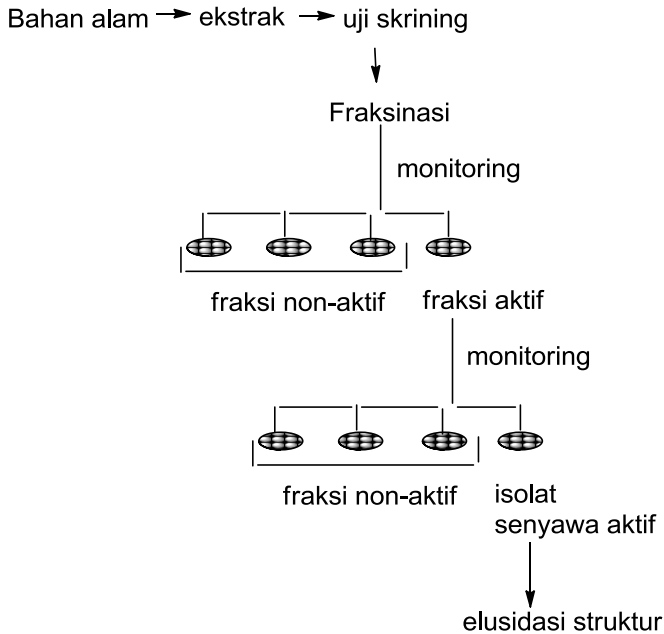
Keragaman senyawa kimia dari sumber bahan alam membuat tanaman, hewan dan laut menjadi sumber potensial penting dari penemuan obat baru, senyawa calon obat dan sumber molekul dengan stereospesifik yang unik bagi sintesis obat. Seleksi tanaman yang akan diteliti bisa didasarkan pada etnofarmakologi. Etnofarmakologi adalah investigasi tanaman yang digunakan oleh etnis tertentu. Misalnya, Indian Amerika

Selatan mengunyah daun coca sebagai stimulan yang bermuara pada penemuan kokain. Kokain akhirnya dikembangkan menjadi anastesi lokal, kokain dan prokain (gambar 1).



Gambar 1. Senyawa obat dari bahan alam

Langkah pertama dalam penelitian kimia bahan alam adalah mendesain tujuan dari penelitian tersebut, apakah untuk meneliti semua kandungan kimia atau bertujuan khusus untuk menyelidiki senyawa aktif tertentu (obat atau calon obat) yang bertanggung jawab pada aktivitas terhadap penyakit tertentu. Hal ini berpengaruh pada skala penelitian, jenis uji aktivitas, prosedur yang harus diikuti dan besarnya anggaran yang diperlukan. (gambar 2).



Gambar 2. Diagram umum proses penemuan senyawa aktif dari bahan alam

Prosedur umum dalam penelitian kimia bahan alam bisa diliaht dari bagan umum. Penelitian biasanya dimulai dengan ekstraksi sample dimana senyawa aktif dipisahkan dari bahan seluler yang tidak diperlukan dengan pelarut yang disesuaikan dengan jenis senyawa aktifnya yang berkaitan dengan jenis uji aktivitas. Ketika ekstrak menunjukkan aktivitas biologis maka fraksinasi

diperlukan untuk memisahkan kelompok senyawa senyawa yang mempunyai kesamaan sifat fisika kimia, misalnya kelarutan dan keasaman. Setiap fraksi diuji dan sampel aktif difraksinasi lagi untuk meningkatkan kemurnian senyawa. Proses pengujian dan fraksinasi dilakukan terus menerus sampai diperoleh senyawa murni yang bertanggung jawab terhadap aktivitas biologis. Namun, proses fraksinasi yang berulang ulang perlu di cegah dengan proses dereplikasi. Senyawa aktif yang diisolasi perlu dimurnikan dan dielusidasi struktur molekulnya. Jika senyawa aktif mempunya potensi komersial, maka sintesis senyawa analog dan studi SAR dan QSAR diperlukan. Namun, jika sumber alam secara komersial bisa menghasilkan senyawa aktif yang cukup maka dapat menghindari proses produksi melalui sintesis beaya tinggi, apalagi dengan kompleksitas stereokimia dari senyawa aktif. Misalnya, senyawa antikanker vincristine, etoposid dan Taxol telah disintesis, senyawa ini memiliki atom carbon kiral yang lebih ekonomis bila diproduksi dengan proses ekstraksi dari bahan lama dibanding dengan sintesis. Konservasi tanaman juga perlu diperhatikan misalnya, isolasi obat kanker Taxol obat antikanker dari kulit pohon yew Pasifik akan

mengakibatkan kepunahan pohon. Sehingga sekarang Taxol diperoleh dengan menggunakan semisintetik dari daun pohon yew dari Eropa dan Amerika.

2. Uji bioaktivitas

Bioassay memiliki dua peran utama dalam isolasi senyawa aktif dari bahan alam, yaitu Uji skrining dan ujin monitoring. Uji skrining digunakan untuk mendeteksi keberadaan senyawa aktif dalam ekstrak, sementara uji monitoring digunakan untuk menelusuri konstituen aktif selama proses isolasi. Jumlah dan tingkat aktivitas kandungan senyawa dalam bahan alam tergantung pada lingkungan, proses pengumpulan, dan penyimpanan. Perlu diingat bahwa kondisi lingkungan akan berpengaruh pada variasi kandungan senyawa. Hal ini berguna dalam uji skrining dan uji monitoring.

2.1. Uji skrining

Uji skrining harus cepat, akurat, mudah dilakukan, memiliki kapasitas sampel yang tinggi, murah dan mudah dilakukan. Uji ini harus juga bisa dilakukan untuk sampel yang mudah dan sukar larut dalam air.

Meskipun, peneliti bisa mengatur rentang batas minimum deteksi bioaktivitas (aktivitas sitotoksik, aktivitas antibiotik atau aktivitas yang lain), kemungkinan terlewatnya senyawa aktif dalam proses skrining masih bisa terjadi. High-throughput screening (HTS) menjadi metode pilihan dalam industri farmasi karena lebih efektif daripada metode skrining yang lain.

Uji skrining dapat diklasifikasikan menjadi bioassay umum dan spesifik. Uji skrining luas bisa digunakan untuk mendeteksi aktivitas secara umum dan skrining spesifik untuk uji aktivitas terhadap penyakit tertentu atau organisme tertentu. Kedua jenis uji ini didasarkan pada respon organ, sel kultur, jaringan, enzim.

Uji skrining dengan organisme

Organisme yang digunakan dalam uji skrining biasanya mikroorganisme, hewan dan manusia. Dua bioassay yang paling umum digunakan adalah uji letalitas udang (Brine Shrimp Lethality Test, BSLT) dan uji penghambatan tumor empedu. BSLT menggunakan udang dari jenis *Artemis salina*. Tes ini biasanya dilakukan dengan cara menambahkan ekstrak dalam konsentrasi yang berbeda ke dalam 5 ml air garam berisi 10 udang. Jumlah udang yang masih hidup dan yang mati

dihitung setelah 24 jam dan hasilnya dinyatakan sebagai LC_{50} atau nilai LD_{50} , dosis yang dibutuhkan untuk membunuh 50 persen.

Uji penghambatan tumor empedu didasarkan pada penghambatan pertumbuhan tumor. Tumor ditumbuhkan dalam cakram kentang dan diinduksi dengan bakteri gram-negatif *Agrobacterium tumefaciens*. Caram ditempatkan dalam media agar dengan campuran ekstrak. Lempeng diinkubasi pada suhu kamar selama dan jumlah tumor dihitung setelah 12 hari. Nilai aktivitas dihasilkan dari ada tidaknya tumor dalam cakram. Penghambatan lebih dari 20% dinyatakan signifikan.

Uji skrining yang paling sederhana adalah dengan menggunakan mikroorganisme seperti bakteri, virus, jamur dan amuba. Uji ini biasanya didasarkan pada penghambatan pertumbuhan mikroorganisme dalam agar oleh ekstrak dan dibandingkan kontrol. Uji ini bisa dilakukan dengan menggunakan cawan petri atau plat mikrotiter (96-well plate).

Kerugian penggunaan organisme adalah spesies sama dan dapat menghasilkan response terhadap obat yang berbeda. Hal ini dapat diatasi dengan pengulangan pengujian untuk mendapatkan data yang layak secara

statistik. Masalah etika menjadikan penggunaan mamalia dalam skrining mendai mahal dan tidak memungkinkan.

Uji dengan sell kultur

Saat ini cell mamalia bisa di isolasi dan ditumbukan dalam media kultur. Cell mamalia biasanya mempunyai reseptor unik yang bisa digunakan dalam uji skrining. Uji ini biasanya didasarkan pada interaksi kadungan senyawa aktif terhadap reseptor dan juga kemampuan penghambatan terhadap reseptor. Sell bisa diproduksi di dalam plat mikrotiter yang bisa digunakan dalam HTS. Ekstrak dengan seri konsentrasi bisa digunakan dan reagen diperlukan untuk menghasilkan warna, fluoresensi, luminesence atau radioaktivitas yang dikorelasikan dengan reseptor atau metabolit yang diproduski oleh sell.

Enzim

Uji ini digunakan untuk menentukan apakah ekstrak mengkativasi atau menghambat enzim. Informasi ini dapat dihubungkan dengan tipe aktivitas dari komponen senyawa dalam ekstrak. Sebagai contoh, aktivasi enzim trypsin dapat menunjukkan kemampuan pembersihan luka nekrosis, ulser dan bases sedangkan aktivitas penghambatan dapat menunjukkan aktivitas antitroboosis,

anti-inflamasi dan anti-fertilas. Uji ini biasanya berupa uji kuantitatif yang didasarkan pada konversi substrat ke produk oleh enzim. Produk dideteksi dengan berbagai metode (radioaktivitas, fluoresen, UV-vis). Hasil reaksi dibandingkan dengan kontrol negatif untuk menunjukkan apakah ekstrak menyebabkan aktivasi atau inhibisi enzim. Sebagai contoh, aktivitas enzim tripsin terhadap *N*-benzoylarginine-4-nitroanalide menghasilkan 4-nitroanilin dapat diukur dengan spektroskopi dengan mengukur absorpsi pada panjang gelombang 400 nm. Kontrol menggunakan senyawa *N*-benzoylarginine-4-nitroanalide tanpa ada senyawa uji. Prosedur uji bisa dilakukan berulang. Pengurangan jumlah 4-nitroaniline mengindikasikan inhibisi tripsin oleh senyawa uji, sedangkan peningkatan mengindikasikan aktivasi tripsin. Enzim terimobilisasi bisa dilakukan dalam plat mikrotiter dalam HTS. Namun demikian jumlah enzim yang bisa digunakan sangat terbatas.

Jaringan terisolasi

Jaringan terisolasi yang klasik adalah pengukuran kontraksi atau penghambatan kontraksi, misalnya usus *Guinea-pig* yang ditempatkan dalam *bath* yang berisi nutrisi dan ekstrak. Jaringan terisolasi biasanya sangat

sensitif dan berbagai jenis jaringan sudah digunakan dalam berbagai uji. Namun demikian variasi respon jaringan terisolasi berkaitan dengan kebutuhan konsentrasi ekstrak yang besar. Selain itu, uji ini juga hanya memberikan informasi awal dimana uji klinis yang memadai terhadap senyawa murni sangat diperlukan.

2.2. Uji monitoring

Uji skrining yang dijelaskan dalam sub bab sebelumnya bisa digunakan dalam uji monitoring untuk melacak senyawa aktif dalam ekstrak dalam proses isolasinya. Sebagai contoh, uji dengan menggunakan usus Guinea-pig sangat cocok sebagai uji monitoring yang cepat dan murah. Namun demikian, proses fraksinasi bertingkat yang dilakukan akan meningkatkan konsentrasi senyawa aktif yang harus diperhitungkan dalam preparasi sampel. Bioaktivitas fraksi dapat juga menghilang selama proses fraksinasi. Hal ini dapat disebabkan oleh dekomposisi senyawa aktif selama proses fraksinasi, hilangnya senyawa yang berperan dalam aktivitas sinergis atau senyawa aktif hilang begitu saja dalam proses fraksinasi.

Perubahan aktivitas karena dekomposisi

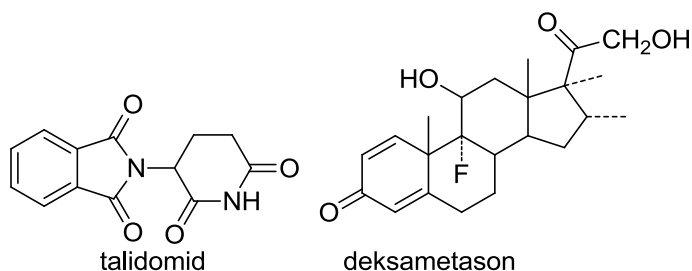
Dekomposisi senyawa aktif bisa terjadi karena kondisi kimia fisika selama fraksinasi atau dikarenakan oleh ketidak stabilan dari senyawa aktif itu sendiri. Dekomposisi biasanya terjadi karena oksidasi, hidrolisis dan polimerisasi. Salah satu penyebab dekomposisi dalam proses fraksinasi adalah karena fraksinasi dilakukan dalam kondisi yang keras (misal panas tinggi). Hal ini dapat diatasi dengan menjaga kondisi yang lunak selama proses, misalnya temperatur rendah, keasaman atau kebasaan disekitar pH normal dan penghilangan pelarut dengan Freeze drying atau distilasi dengan vakum. Penyebab dekomposisi yang lain adalah hilangnya senyawa antioksidan alami, meningkatnya enzim yang mengkatalisis proses dekomposisi, pengaruh cahaya dan udara. Pengaruh udara dan cahaya dapat dicegah dengan melakukan fraksinasi dalam nitrogen. Mikroorganisme juga bisa menjadi penyebab terjadinya dekomposisi, dalam hal ini sterilisasi dapat dilakukan.

Aktivitas berubah karena perubahan aktivitas sinergisme

Sinergi muncul ketika campuran dari dua atau lebih senyawa mempunyai aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas individual. Akibatnya, ketika

salah satu komponen campuran hilang (dalam proses fraksinasi) maka aktivitas biologisnya akan menurun secara signifikan. Sebagai contoh, ekstrak X terdiri dari komponen A, B, C dll dengan aktivitas masing masing a,b,c dll. Total aktivitas dalam konsep sinergiems dapat dijelaskn dalam formula sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas total fraksi x} > (a+b+c+\dots)$$



Gambar 3. Contoh sinergisme talidomid dengan deksametason

Meskipun mekanisme sinergisme belum dapat diterangkan secara detail dan jelas, fenomena keberadaan aktivitas sinergisme dapat dilihat dari kenyataan dilapangan. Sebagai contoh, aktivitas thlidomide (obat myeloma) akan meningkat aktivitasnya jika diberikan bersama dengan dexamehason dimana dezametason

sendiri tidak mempunyai aktivitas terhadap myloma (gambar 3).

Perubahan aktivitas karena hilang selama proses fraksinasi

Senyawa aktif bisa tertahan dalam poses fraksinasi. Sebagai contoh, senyawa aktif terikat kuat atau terikat secara permanen dalam fasa stasioner kromatografi. Sehingga, selama proses kromatografi, senyawa aktif akan hilang atau tidak muncul dalam fraksi produk kromatografi. Selain itu, penggunaan distilasi dan sublimasi untuk meningkatkan konsentrasi fraksi dapat mengakibatkan terbentuknya kodestilat atau kosublimat yang dapat mengakibatkan senyawa aktif hilang selama distilasi atau sublimasi.

3. Dereplikasi

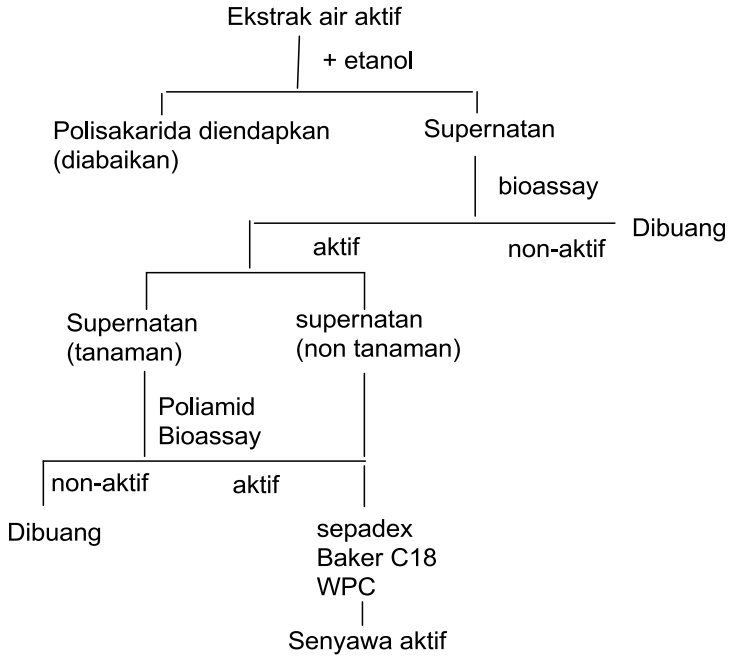
Dereplikasi adalah teknik untuk menghindari isolasi senyawa senyawa yang sudah diteliti/diketahui sebelumnya. Hal ini dapat dilakukan dengan teknik skrining kimia menggunakan kromatografi, NMR, spektroskopi UV-vis dan hasilnya dibandingkan dengan database. Namun demikian tehnik ini tidak bisa

memberikan jawaban yang mutlak. Selain itu, teknik dereplikasi digunakan pula pada proses pembersihan (misalnya penghilangan klorofil dari ekstrak daun).

Teknik dereplikasi didesain secara spesifik tergantung pada penelitian yang dilakukan. Misalnya, tahun 1987-1991, American National Cancer Institute (NCI) telah melakukan uji lebih dari 40,000 ekstrak air dan organik dari tanaman yang tujuannya untuk mencari senyawa aktif anti-HIV. Sekitar 15% ekstrak yang menunjukkan aktivitas mempunyai kandungan senyawa dalam kelas yang sama. Cardellina dkk merancang protokol dereplikasi terhadap ekstrak air untuk menghindari senyawa aktif yang sudah diketahui sebelumnya. Hal ini dapat menghasilkan penemuan senyawa aktif baru dengan kelas senyawa yang berbeda. Dereplikasi bisa didasarkan pada ukuran molekul, massa dan polaritas dari komponen kimia ekstrak (gambar 4).

Langkah pertama dalam dereplikasi adalah dengan mengendapkan senyawa aktif anti-HIV yang berupa polisakarida sulfat. Senyawa ini sudah diketahui sebelumnya mempunyai aktivitas terhadap HIV. Pengendapan dapat dilakukan dengan penambahan

etanol. Endapan kemudian dipisahkan dari supernatan. Supernatan kemudian dilanjutkan dengan skrining kedua.



Gambar 4. Tahap-tahapan dereplikasi.

Ekstrak kemudian dilewatkan kolom poliamid untuk menghilangkan tanin. Karena tanin juga sudah diketahui mempunyai aktivitas anti-HIV. Selanjutnya sampel sisa dilewatkan kartrid kromatografi (sephadex G-25, C₁₈ dan WPC4). Fraksi yang diperoleh kemudian diuji aktivitasnya. Dereplikasi merupakan teknik yang dikembangkan secara spesifik selama proses

penambahan molekul dalam tanaman untuk aktivitas tertentu.

4. Analisis struktur dari isolat

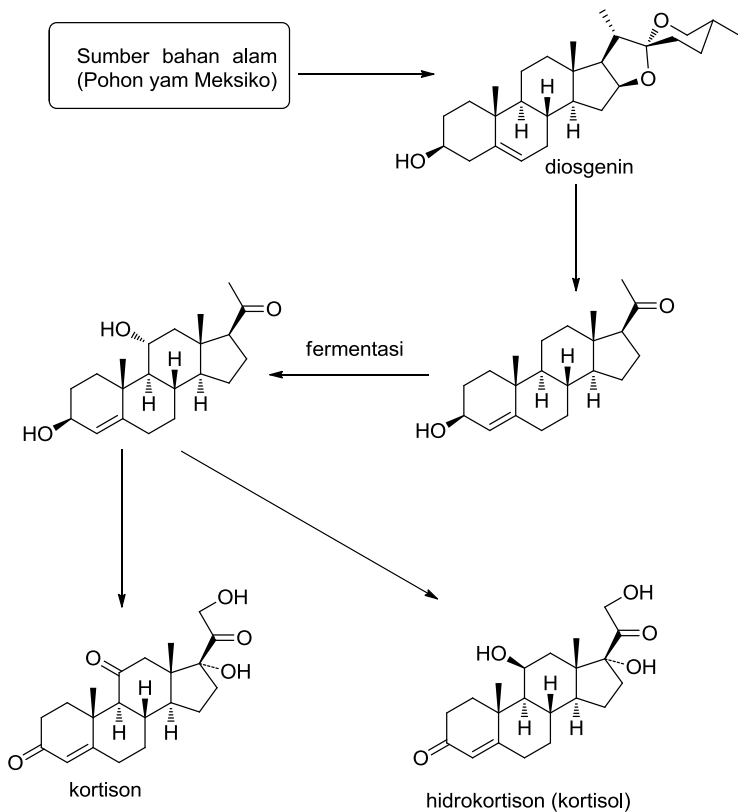
Kemurnian isolat harus diuji sebelum dilakukan elusidasi struktur. Karena kebanyakan isolat yang diperoleh dalam jumlah sedikit dan sangat susah untuk dikristalkan. Sehingga uji kemudian bisa dilakukan dengan kromatografi gas maupun HPLC.

Struktur molekul dari isolat yang diperoleh dari fraksinasi ditentukan dengan analisis kombinasi dari data Mass Spectrometry, Nuclear Magnetic Resonance, Infra red, UV-vis. Namun demikian fraksi aktif kadang masih berupa campuran sehingga penentuan struktur bisa dibantu dengan tehnik tandem, GC-MS, LC-UV, LC/MS, LC-NMR dan LC-DAD. Dalam prosedur ini campuran sebelumnya akan dipisahkan dan kemudian masuk ke tahap spektrokopi.

5. Pengembangan senyawa aktif

Sintesis senyawa aktif dari bahan alam terkadang menjadi sangat mahal ketika berurusan dengan senyawa aktif dengan banyak atom karbon kiral. Sehingga proses

produksi dilakukan dengan peningkatan produksi tanaman atau mikroorganisme sumber senyawa aktif tersebut. Secara umum senyawa dari alam berupa calon obat yang bisa dikembangkan sebagai obat. Sebagai contoh, penemuan cortison dan hidrokortison dari tanaman Yam Meksiko (gambar 5). Senyawa ini mempunyai beberapa atom karbon kiral sehingga cukup rumit untuk disintesis. Karena kebutuhan pasar yang sangat tinggi, senyawa ini akhirnya disintesis dari hecogenin yang diisolasi dari daun sisal. Selain itu senyawa ini disintesis dari diosgenin yang diisolasi dari tanaman yam Meksiko. Sintesis dimulai dari merubah diosgenin menjadi progesteron. Progesteron kemudian difermentasi dengan *Rhizopus arrhizus* atau *R. nigricans* untuk menghasilkan 11alpha-hydroxyprogesteron dengan yiel 85%. Yang menarik adalah senyawa prodrug kortisol akan dimetabolisme didalam hati menjadi senyawa aktif hidrokortisol.



Gambar 5. Proses produksi senyawa kortison dan hidrokortison

6. Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses awal dalam separasi senyawa yang diinginkan dari bahan awal. Hampir semua ekstrak diperoleh dalam bentuk cairan kental dan merupakan campuran yang kompleks. Kadang ekstrak memerlukan

pembersihan dari komponen-komponen struktural tanaman. Ekstraksi merupakan pemisahan senyawa yang diinginkan, dari materi seluler dan senyawa kimia seperti lipid, protein dan polisakarida. Prosedur ekstraksi disesuaikan dengan tujuan ekstraksi, skala, jenis uji skrining dan jenis senyawa yang akan diekstraksi.

Sebagai contoh, penelitian tentang senyawa aktif anti-HIV menggunakan bioassay yang spesifik terhadap senyawa tertentu, sedangkan ekstrak mengandung berbagai macam senyawa. Sehingga kebutuhan bioassay yang bersifat umum (berbagai senyawa) sangat diperlukan.

Jika ekstrak diambil dari tanaman langsung, maka proses skrining umum bisa digunakan, tetapi bila ekstraksi berdasarkan pada etnofarmakologi, dimana ekstraksi disesuaikan dengan cara peramuan tradisional, maka bioassay harus disesuaikan sebisa mungkin dengan kondisi dari preparasi obat tradisional tersebut.

Skala ekstraksi juga perlu diperhatikan, misalnya skala kecil hanya untuk uji aktivitas. Untuk studi lebih lanjut maka peningkatan skala akan membutuhkan alat, jumlah bahan baku yang besar. Tipe senyawa yang ingin diekstrak juga berpengaruh pada pemilihan metode

ekstraksi. Pelarut polar akan mengekstrak senyawa polar sedangkan pelarut non-polar akan mengekstraksi senyawa non-polar. Pemilihan pelarut bisa disesuaikan dengan tujuan penelitian (tabel 1)

Table 1. Pelarut dalam ekstraksi

Polaritas	Pelarut	Kelas senyawa
Rendah	Heksana	Lipid, lilin, minyak atsiri
	Kloroform	Alkaloid, aglikon
	Eter	Alkaloid dan aglikon
	Etanol	Glikosida
Tinggi	Air	Asam amino, gula dan glikosia

Tingkat keasaman dan kebasaaan (pH) dari pelarut juga akan berpengaruh pada hasil ekstraksi. Pelarut asam akan mengekstrak senyawa basa seperti alkaloid, amina dan asam amino. Sedangkan pelarut basa akan mengekstrak senyawa asam seperti fenol, asam karboksilat, asam sulfonat dan asam fosfat. Pelarut asam dan basa akan bereaksi dengan senyawa konjugatnya dan menghasilkan garam.

Penggunaan pelarut asam dan basa dapat mempengaruhi stabilitas dari senyawa yang diekstraksi. Misalnya, kondisi asam atau basa dapat menyebabkan hidrolisis

dari senyawa ester dan amida, terlebih bila ekstraksi dilakukan dalam suhu kamar.

Metode ekstraksi

Sebelum proses ekstraksi, bahan dikeringkan dahulu untuk membuang air kemudian diserbuk. Secara umum, bahan dicampur langsung dengan pelarut yang sesuai dalam suhu dan waktu tertentu. Khusus untuk ekstraksi dalam bentuk infusa, sample bisa direflux dengan pelarut yang sesuai dalam suhu ruangan atau penambahan panas. Kerugian dari penggunaan panas adalah kemungkinan terjadinya dekomposisi kandungan aktif. Keuntungan dari penggunaan panas adalah dapat meningkatkan kapasitas dan efektifitas ekstraksi. Kerugian yang lain adalah penggantian pelarut yang sudah jenuh dengan yang baru, namun hal ini bisa diatasi dengan penggunaan Soxhlet.

Cara ekstraksi yang lain adalah distilasi uap, yaitu penggunaan aliran uap air ke dalam bahan yang akan diekstrak. Dengan menggunakan prinsip penurunan tekanan uap dikarenakan aliran uap air, maka senyawa yang mempunyai titik didih tinggi akan ikut terlarut bersama dengan uap air. Distilat yang dihasilkan dapat

didiamkan untuk membentuk dua lapisan air dan lapisan organik yang bersisi ekstrak.

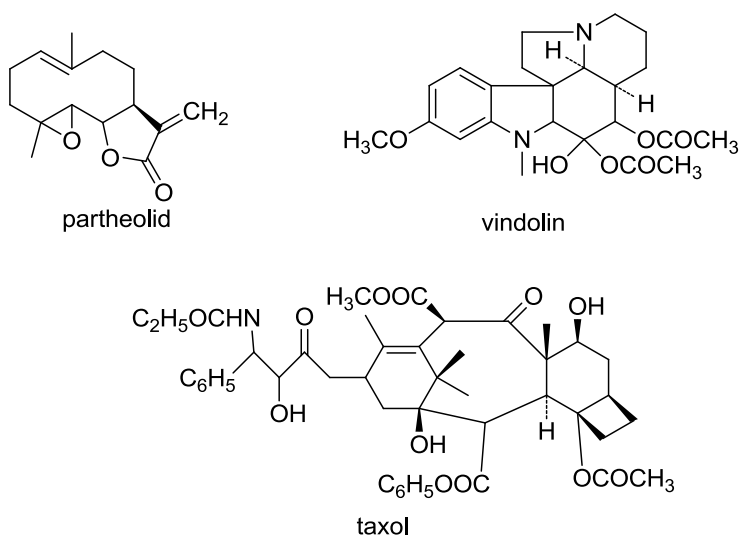
Supercritical fluid extraction

Metode ini menggunakan pelarut yang dikondisikan pada suhu dan tekanan kritis seperti gas yang dikondisikan dalam bentuk larutan. Gas karbondioksida cair adalah pelarut kritis yang biasa digunakan dalam metode ini. Karena metode hanya dilakukan pada suhu yang sangat rendah maka dekomposisi senyawa sangat minimal. Metode ini juga sudah dikembangkan dalam skala besar/industri. *Supercritical carbon dioxide* dapat digunakan untuk mengekstrak minyak atsisi, lipid, triterpen, steroid, alkaloid dan karotenoid dari bahan alam. Metode ini digunakan juga dalam industri untuk mengekstrak asam bitter dari "hop" dan digunakan untuk membersihkan biji kopi dari kafein. Metode ini juga berhasil digunakan untuk mengekstrak senyawa antikanker Taxol, alkaloid vindolin dari *Catharantus roseus* dan parthenolide dari feverfew (gambar 7).

Pembersihan

Ekstrak dari bahan alam juga mengandung komponen senyawa dalam jumlah yang banyak yang membuat fraksinasi menjadi lebih sulit. Misalnya, komponen

tannin, karoten dan klorofil dapat menyebabkan masalah dalam bioassay. Tannin mampu berikatan dengan protein yang berpengaruh dalam bioassay menggunakan enzim. Reaktivitas ini juga menambah masalah dalam isolasi protein dalam bahan alam.



Gambar 7. Senyawa obat dari bahan alam yang diisolasi menggunakan *super-critical fluid*.

Senyawa anorganik seperti garam kadang menjadi masalah dalam prosedur faksinasi. Protokol yang disiapkan tergantung dari senyawa apa yang akan di buang dari ekstrak. Namun demikian senyawa yang dipisahkan jangan serta merta dibuang, karena senyawa

ini bisa jadi mempunyai aktivitas untuk diteliti misalnya tannin (tabel 2).

Tabel 2. Metode pembersihan ekstrak dari senyawa umum

Senyawa	Metode	Keterangan
Klorofil	Pengendapan dengan timbal subasetat Partisi	Untuk ekstrak alkoholik, diencerkan dengan air dan ekstraksi dengan eter
Polifenol	Sephadex LH-20 Partisi	Hexane digunakan untuk menghilangkan polifenol
Protein	Pengendapan dengan amonium sulfat Partisi	Untuk ekstrak alkoholik. Heksana digunakan untuk menghilangkan senyawa non-polar
Polisakarida	Pengendapan dengan etanol atau aseton Dialisis	

7. Fraksinasi

Metode fraksinasi yang paling umum digunakan adalah partisi dan kromatografi. Metode lain yang jarang dipakai adalah pengendapan, fraksinasi ditilasi, distilasi uap dan dialisis. Metode dipilih berdasarakan sifat alami dari ekstrak dan kebutuhan dalam penelitian. Namun demikian, dalam frkasinasi harus dijaga seminimal mungkin karena terjadinya dekomposisi. Pemilihan

pelarut harus didasarkan kepada toksisitas dan metode bioassay yang digunakan dan juga polaritas dari kandungan senyawa aktif.

Partisi cair-cair

Partisi cair-cair adalah pemisahan senyawa dalam dua larutan yang tidak campur. Distribusi ini mengikuti hukum partisi dimana P adalah tetap dalam suhu yang tetap.

$$\text{Koefisien partisi (P)} = \frac{[\text{solut dalam pelarut 1}]}{[\text{solut dalam pelarut 2}]}$$

Berdasarkan rumus diatas, proses ekstraksi akan efektif jika dilakukan berkali kali dimana fraksi yang diperoleh kemudian dikumpulakn menjadi satu. Proses partisi dalam laboratorium bisa dilakukan dengan menggunakan corong pisah. Larutan air dimasukkan dalam corong pisah kemudian pelarut organik yang sesuai (tidak campur) dimasukkan. Campuran dibiarkan dalam kesetimbangan kemudian lapisan pelarut organik dipisahkan dari lapisan air. Proses partisi bisa dilakukan secara bertingkat dengan pelarut yang semakin polar maupun sebaliknya. Misalnya, partisi dimulai dengan menggunakan pelarut heksana, kloroform, etil asetat dan

butanol. Proses ini akan menghasilkan fraksi dengan kandungan senyawa yang berbeda berdasarkan tingkat kepolarnya.

Senyawa asam atau basa dapat dipartisi dengan mengatur pH dari ekstrak sebelum dilakukan partisi. Misalnya, larutan air berisi garam alkaloid bisa difraksinasi berdasarkan pada kekuatan kebasaaan dengan cara menaikkan derajat alkalinitas. Penambahan alkali yang tepat bisa merubah garam alkai menjadi bentuk tak terionkan yang memungkinkan untuk diekstraksi dengan pelarut organik. Proses netralisasi ini bisa dilakukan bertahap sampai semua kandungan sudah terfrakasinasi. Metode ini juga dilakukan terhadap garam dari asam dimana penetralan dilakukan dengan penambahan asam. Partisi cair-cair sangat membutuhkan waktu dan tenaga tetapi bisa dilakuakn dengan cara autmatisasi yaitu penggunaan Craig counter-current distribution (CCCD) dan steady state distribution (SSD).

Pembentukan garam

Pergerakan molekul dari lapisan air ke lapisan organik dapat ditingkatkan dengan penggaraman, yaitu penambahan anorganik larut air seperti NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kedalam lapisan air. Metode ini dapat mengurangi

kelarutan senyawa non-ionik didalam air tetapi meningkatkan kelarutan senyawa tersebut dalam lapisan organik.

Metode kromatografi

Metode ini paling banyak digunakan dalam fraksinasi baik kromatografi lapis tipis (Thin layer chromatography-TLC) dan kolom kromatografi (Column chromatography). Pemilihan metode kromatografi yang tepat biasanya didasarkan dari data awal atau dari pengalaman para peneliti.

Tabel 3. Reagen pewarna dalam TLC

Reagen	Warna	Kelas senyawa
Anisaldehyd	Ungu, biru dan merah	Terpenoid, lignan dan gula
Dragendorff's	Orange	Alkaloid
Lieberman-buchard	Oranye, merah, biru dan ungu	Sterol, glikosida triterpen
Ninhidrin	Ungu	Asam amino, peptid dan protein
Atimoni triklorida		Terpenoid
2,4-dinitrofenilhidrazin	Kuning dan oranye	Aldhid dan keton

Analytical-TLC sangat membantu dalam pemilihan pelarut yang akan digunakan dalam preparative-TLC. Metode ini mampu menghasilkan jumlah senyawa murni yang dibutuhkan dalam penentuan struktur kimia. Deteksi bercak kromatogram dapat dilakukan dengan bantuan sinar UV maupun pereaksi warna seperti iodide, vanilin, molybdate dan lain lain (Table 3).

Kromatografi kolom yang paling banyak digunakan adalah HPLC dan GC. Kedua metode ini bisa ditandemkan dengan metode analitik yang lain seperti *Mass Spectrometry* dan *Nuclear Magnetic Resonance*.

Pengendapan

Isolasi senyawa kadang bisa dilakukan dengan pembentukan endapan dalam larutan. Tiga jenis pengendapan yang umum dilakukan adalah salting out, penurunan solubilitas dan pembentukan garam tidak larut. Teknik teknik ini bisa digunakan dalam fraksinasi. Salting out biasa digunakan dalam pemisahan protein dari larutan. Penurunan solubilitas bisa dilakukan dengan penambahan larutan dimana senyawa tersebut kurang larut. Pembentukan garam tidak larut bisa dilakukan reagen tertentu.

Distilasi

Fraksinasi distilasi dan distilasi dengan uap air (*steam distillation*) dapat digunakan untuk memisahkan senyawa atsiri dimana senyawa ini banyak digunakan di industri farmasi, parfum, perasa dan lain lain. Ekstraksi senyawa minyak atsiri dalam skala industri biasanya dilakukan dengan menggunakan *steam distillation*. Misalnya, pepermin dari *Mentha piperita* var. *vulgaris* dan *Mentha piperita* var. *officinalis*.

Dialisis digunakan untuk memisahkan senyawa dengan berat molekul dibawah 1000 Dalton dari molekul besar dalam larutan air. Molekul kecil mampu melewati membran semipermeabel didasarkan pada perbedaan konsentrasi. Elektroforesis digunakan untuk memisahkan komponen yang mempunyai muatan elektrik. Secara umum digunakan sebagai metode analitik, akan tetapi elektroforesis preparatif bisa digunakan untuk fraksinasi ekstrak seperti halnya tehnik TLC preparatif.

8. Contoh sejarah penemuan obat dari bahan alam (Taxol)

Sejarah dimulai dari program skrining antitumor oleh J.H. Harwell dari American National Cancer Institute

(NCI) di tahun 1960. Pada tahun 1962, laboratorium Dr. M.E. Wall di Research Triangle Institute (RTI) meneliti aktivitas ekstrak terhadap sel 9KB yang menunjukkan korelasi positif dengan uji *invivo* terhadap tikus leukemia L-1210. Salah satu ekstrak yang diteliti adalah ekstrak dari *Taxus brevifolia*. Penelitian awal, dari 12 kg batang dan kulit batang kering diekstraksi dengan 95% ethanol. Isolasi senyawa aktif dilanjutkan dengan uji aktivitas terhadap tumor Wakler-256. Ekstrak kemudian dipartisi dengan pelarut kloroform dan metanol (4:1) dimana lapisan organik menghasilkan 146 g fraksi padat dengan aktivitas yang bagus terhadap tumor 5WM. Fraksi ini kemudian difraksinasi dengan *Craig counter-current* yang menghasilkan 0,5 g Taxol (0,004%). Pada tahun 1971, struktur molekul Taxol berhasil dielusidasi oleh Wani. Pengembangan calon obat Taxol sangat lambat dikarenakan oleh rendemen yang sangat rendah (0,004%), ketersediaan bahan baku (kulit batang *Taxus*) dan juga oleh kompleksitas struktur senyawa taxol. Senyawa taxol sangat susah larut sehingga tidak mungkin untuk dikembangkan dalam sediaan intravena. Masalah kelarutan ini akhirnya bisa diatasi dengan penggunaan campuran polietoksi minyak ceter dan alkohol.

Persiapan uji klinis Taxaol dimulai di tahun 1971 dan masuk pada uji klinis I pada tahun 1983 dan fase II pada tahun 1985. Tahun 1988 Jean-Noel Dennis mengembangkan semisintesis taxol dari 10-deacetylbaconin III yang diisolasi dari *Taxus baccata*. Pada tahun 1991 NCI memberikan hak Bristol-Myers Squibb untuk mengembangkan produk dan pemasaran taxol. Tahun 1992, taxol mendapatkan persetujuan dari FDA. Hal ini menunjukkan sejarah panjang taxol yang dimana membutuhkan waktu 32 tahun dari penemuan sampai taxol bisa dipasarkan.

9. Tugas dan diskusi

Penemuan obat dalam skala laboratorium

Tugas kelompok untuk mencari jurnal yang berkaitan dengan penemuan senyawa aktif baru dari publikasi ilmiah yang bereputasi. Mahasiswa membuat rangkuman metode yang dipakai dan dipresentasikan dalam diskusi

Penemuan obat dalam skala industri

Mahasiswa mencari dan merangkum metode yang dipakai dalam produksi senyawa artemisinin dari pengembangan produksi tanaman sumber artemisinin. Hasil studi literatur disampaikan dalam diskusi.

10. Rangkuman

Penemuan senyawa obat dan calon obat baru dari bahan alam memerlukan tahapan tahapan yang panjang dari ekstraksi, fraksinasi, isolasi, penentuan struktur senyawa aktif obat. Proses ini dikawal dengan uji aktivitas biologis yang dari skrining awal sampai uji skrining.

Setelah senyawa aktif (obat) diisolasi dan dielusidasi strukturnya maka dilihat dari sisi komersilnya apakah bisa disintesis, semi sintesis atau tetap harus dirproduksi dari bahan alam.

Senyawa calon obat dari bahan alam bisa juga dikembangkan dalam bentuk analog yang lebih aktif melalui kajian SAR. Formulasi juga dikembangkan untuk mengoptimalkan profil farmakokinetik. Proses akhir dari obat dari bahan alama adalah uji pre klinis, klinis tahap I dan II. Setelah proses yang panajang ini, obat dari bahan alam akhirnya bisa dipasarkan.

11. Rujukan pengayan

Thomas, G., **2007**, Medicinal Chemistry, edisi II, John Willey and Sons, New York, USA

12. Latihan soal

1. Jelaskan fungsi ekstraksi dan fraksinasi dalam isolasi senyawa aktif
2. Berikan contoh diagram proses isolasi senyawa aktif
3. Berikan alasan kenapa kita menghindari penggunaan larutan asam dalam proses ekstraksi peptida dan protein dari bahan alam
4. Jelaskan hal hal yang perlu diketahui dalam mendesain prosedur ekstraksi
5. Jelaskan prosedur ekstraksi untuk mendapatkan protein dari ekstrak air yang mengandung campuran protein, klorofil dan garam NaCl