

REVIEW: PROFILING SENYAWA KUERSETIN DARI TANAMAN COCOR BEBEK (*Kalanchoe pinnata*) DENGAN MENGGUNAKAN BERBAGAI METODE ANALISIS

Vania Putri, Aliya Nur Hasanah

Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran

Jl. Raya Bandung Sumedang Km 21 Jatinangor 45363

Telepon: (022) 7796200, Faksimile: (022) 7796200

putrivania08@gmail.com, aliya.n.hasanah@unpad.ac.id

ABSTRAK

Cocor Bebek (*K. pinnata*) merupakan tanaman yang banyak ditemukan di Indonesia dengan berbagai aktivitas farmakologi karena adanya beberapa senyawa aktif yang terkandung dalam tanaman ini. Salah satu senyawa penting tersebut adalah kuersetin. Saat ini, banyak penelitian yang membahas tentang *profiling* kuersetin dalam tanaman ini dengan menggunakan berbagai metode analisis. Profiling terkait kuersetin dapat dilakukan dengan menggunakan metode analisis yaitu *SDS PAGE*, *LC-MS-MS*, *TLC*, *HPLC-DAD*, dan *1D-2D NMR*.

Kata kunci: *Kalanchoe pinnata*, kuersetin, metode analisis

ABSTRACT

Cocor Bebek (*K. pinnata*) is a plant that widely found in Indonesia with various pharmacological activities because there are some active compounds present in this plant. One of that important compounds is quercetin. Latetly, there are so many research that discusses about *profiling* of quercetin in this plant by using various methods of analysis. Profiling of quercetin can be done by using analysis method such as *SDS PAGE*, *LC-MS-MS*, *TLC*, *HPLC-DAD*, and *1D-2D NMR*.

Keywords: *Kalanchoe pinnata*, quercetin, analysis method

PENDAHULUAN

Cocor Bebek (*Kalanchoe pinnata* Lam.Pers.) merupakan tanaman dengan ciri-ciri yaitu daunnya yang tebal dan berair (Materia Medika Indonesia, 1989; Medicinal Herb Index, 1995), bunga yang berwarna hijau muda kekuningan, dan dapat tumbuh hingga 1-2 m (Chibueze, 2013). Tanaman ini tumbuh di daerah tropis seperti Vietnam, Filipina, dan Indonesia (De Padua LS *et al.*, 1983; Medicinal Plants Hanoi, 1990; Medicinal Herb Index, 1995). *K. pinnata* (khususnya bagian daun) sering dijadikan sebagai obat tradisional karena memiliki Berbagai macam khasiat seperti: antikanker, antidiabetes, antifungal, antimikroba, antiinflamasi dan analgesik, antiulser, antiasma, antioksidan, dan aktivitas sedatif dari sistem saraf (Supratman *et al.*, 2001; J.A.O *et al.*, 2005; D.A. Alabi *et al.*, 2005; E.E Obaseiki-Ebor, 1985; Sidharta PA *et al.*, 1990; Ozolua RI *et al.*, 2010; Gupta S *et al.*, 2011; Yemitan OK *et al.*, 2005).

Aktivitas-aktivitas ini dapat dihasilkan karena peran dari senyawa

kimia yang terkandung didalamnya seperti: alkaloid, fenol, flavonoid, tanin, antosianin, glikosida, bufadienolida, saponin, kumarin, sitosterol, kuinin, dan lektin (Adinike K *et al.*, 2004; Okwu DE *et al.*, 2006; Hossan MS *et al.*, 2009; Kanika, 2011; Gaiind K *et al.*, 1972; Liu KCS *et al.*, 1989).

Tanaman ini merupakan spesies Crassulaceae yang kaya akan senyawa fenolik, terutama kuersetin dimana kuersetin ini merupakan flavonoid utama dari spesies ini (S.S. Costa *et al.*, 2008). Oleh karena itu, banyak sekali penelitian yang melakukan identifikasi kuersetin dalam tanaman ini. Berikut beberapa metode yang sering digunakan yaitu: SDS PAGE, HPLC, LC-MS. Penelitian-penelitian diatas bertujuan untuk kepentingan pengembangan obat-obat tradisional yang nantinya bisa dijadikan pilihan terapi disamping obat-obat sintetis.

Sampai saat ini resume terkait teknik profiling kuersetin dalam tanaman cocor bebek belum pernah dilakukan. Mengingat pentingnya hal ini untuk

memudahkan dalam mempercepat penemuan obat maka diperlukan *review* mengenai data penelitian *profiling* kuersetin yang dapat menggabungkan serta membandingkan keseluruhan data mengenai penelitian *profiling* kuersetin dari tanaman ini. Selain itu, jurnal *review* ini bertujuan untuk memberikan bahan bacaan yang baru yang dapat berguna bagi dunia sains.

METODE

Metode yang dilakukan dalam proses *review* ini yaitu studi literatur. Studi literatur ini dilakukan dengan cara mencari topik-topik mengenai cocor bebek, flavonoid, kuersetin, dan metode analisis kandungan senyawa kuersetin pada artikel, buku, maupun jurnal-jurnal penelitian.

Metode *profiling* kuersetin

Penelitian ini dimulai dari pengumpulan tanaman, aklimatisasi, determinasi, ekstraksi, dan analisis *profiling* kuersetin dengan menggunakan *SDS PAGE*, *LC-MS-MS*, *TLC*, *HPLC-DAD*, dan *1D-2D NMR*.

Pada proses pengumpulan tanaman, diperlukan data-data mengenai tanggal dan waktu penanaman, perlakuan yang diberikan pada saat proses pertumbuhan tanaman, serta tanggal dan waktu pemanenan tanaman.

Langkah selanjutnya yaitu proses aklimatisasi yang merupakan proses penyesuaian atau adaptasi suatu organisme dengan lingkungan baru yang akan ditempatinya. Selama proses ini, tanaman harus terus diamati perkembangannya secara rutin.

Selanjutnya dilakukan proses ekstraksi. Terdapat dua jenis proses ekstraksi dalam jurnal *review* ini yaitu:

1. Ekstraksi protein

Proses ini dilakukan sebagai preparasi untuk metode analisa *SDS-PAGE* dan *LC-MS-MS*. Dilakukan dengan cara daun segar cocor bebek diekstrak dalam dapar yang berisi dapar fosfat 0,2 M (pH 7,2), NaCl 150 mM, 8 M urea, 1% (w/v) CHAPS, 10% (v/v) gliserol, dan 2 mM EDTA. Lalu campuran tersebut disentrifugasi (14.000 rpm, 25 menit, 18°C) dan hasil

supernatannya disimpan pada suhu 4°C (Abhishek *et al.*, 2014).

2. Ekstraksi senyawa

Proses ini dilakukan sebagai preparasi untuk metode analisa:

- TLC dan HPLC-DAD

Proses ekstraksi dilakukan dengan cara pengumpulan daun lalu ditimbang kemudian diekstraksi dengan air destilata pada suhu 50°C yang dijelaskan dalam Muzitano *et al.* (2011). Sampel yang digunakan pada metode ini memiliki variasi perlakuan cahaya (L.B. dos S.N *et al.*, 2015).

- 1D-2D NMR

Proses ekstraksi dilakukan dengan cara mengekstrak 1,8 kg daun cocor bebek dengan 5 mL metanol selama 24 jam pada suhu ruang sebanyak tiga kali menggunakan evaporator. Sebanyak 100 gr ekstrak metanol dipartisi dengan n-heksan, etanol asetat, dan diklorometana, secara berurutan untuk menghasilkan ekstrak n-heksan (20,77 gr), ekstrak etanol (4,4 gr), dan ekstrak diklorometana (0,04 gr). Fraksi etanol asetat dielusikan dengan n-heksan-

etanol asetat untuk menghasilkan sembilan fraksi (F1-F9). F4 dan selanjutnya dikromatografi menggunakan silika gel, dan dielusikan dengan pelarut n-heksan-etanol asetat untuk menghasilkan kristal kuning (Senyawa A) (Akhmad D *et al.*, 2013).

Selanjutnya dilakukan analisis *profiling* kuersetin dengan berbagai metode:

1. LC-MS-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrophotometry-Mass Spectrophotometry)

Setelah dilakukan ekstraksi protein, tahap selanjutnya yaitu tahap pemisahan protein dengan SDS PAGE (Sodium Dodesil Sulfat- Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Pada tahap ini digunakan gel berukuran 6 cm x 8,4 cm yang mengandung 10% *resolving gel* dan 4% *stacking gel*. Kemudian 20% (v/v) sampel buffer [0,5 M Tris HCl (pH 6,8), 20% (v/v) gliserol, 10% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) bromofenol biru, 5% (v/v) β -mercaptoethanol] ditambahkan ke dalam

ekstrak hasil dari tahap sebelumnya. Kemudian dengan tegangan 200 v dilakukan elektroforesis pada gel. Setelah pemisahan tersebut, dilakukan pewarnaan menggunakan *Coomasie blue*.

Hasil migrasi *band* protein yang telah diwarnai, dipotong dan di transfer ke *eppendoff*. Potongan *band* disimpan dalam air destilata, lalu diidentifikasi menggunakan *LC-MS-MS* (Abhishek *et al.*, 2014).

2. TLC (Thin Layer Chromatography)

Metode ini menggunakan silika gel 60 serta fase gerak yang mengandung n-butanol/ asam asetat/ air. Sampel flavonoid yang telah diisolasi dari *K. pinnata* diambil sebanyak 50 μ L; MF [*quercetin 3-O- α -L-arabinopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2) α -L-rhamnopyranoside*]; dan *quercitrin* (*quercetin 3-O- α -rhamnopyranoside*), keduanya sebanyak 1 mg/mL, dianalisis menggunakan *TLC* untuk dijadikan perbandingan dengan sampel ekstrak 20 mg/mL. Setelah itu, *plate* dikeringkan dan seluruh komponen diobservasi dibawah

sinar UV (254 dan 365 nm). *Plate* tersebut disemprotkan dengan reagen NP/PEG (1% *diphenylboryl oxyethylamine in methanol*/ 5% *polyethylene glycol in ethanol*) lalu divisualisasikan dibawah sinar UV-365 nm dan hasilnya didokumentasikan dengan menggunakan *compact digital camera*. Setelah itu, hasil gambar tadi diproses dengan menggunakan program *ImageJ* (L.B. dos S.N *et al.*, 2015).

3. HPLC-DAD (Diode Array Detector High Performance Liquid Chromatography)

Ekstrak dianalisis dengan *HPLC-DAD* dengan rentang panjang gelombang 180-900 nm. Pada metode ini digunakan kolom fase terbalik (5 μ m, 250 x 4 mm) pada suhu 26°C. Eluen yang digunakan yaitu air yang disesuaikan hingga pH 3,2 dengan asam fosfat; dan CH_3CN . Aliran elusi yang digunakan yaitu 1.0 mL/min, dan 20 μ L masing-masing sampel yang diinjeksikan.

Pada metode ini digunakan juga senyawa isolasi mayor flavonoid dan *quercitrin* sebagai kontrol (1 mg masing-

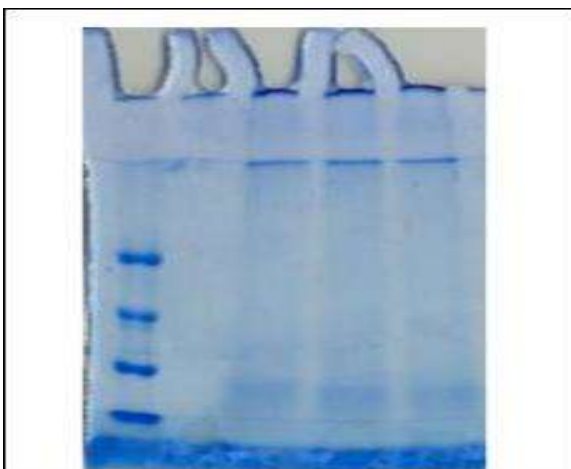
masing senyawa ini dilarutkan dalam 1 mL air *ultrapurified*. Hasil waktu retensi dan spectrum UV senyawa ini berguna untuk *peak* kromatogram pada 254 nm. Kurva kalibrasi *quercitrin* ($y = 5E+06x - 50065$, $R^2 = 0.9998$) digunakan untuk mengkuantifikasi *quercitrin* dalam ekstrak. Begitu pula dengan mayor flavonoid (L.B. dos S.N *et al.*, 2015).

4. 1D-2D NMR

Senyawa A yang dihasilkan pada prosedur sebelumnya dianalisis dari *infrared*, *mass spectroscopy*, dan *1D-2DNMR* (Akhmad D *et al.*, 2013).

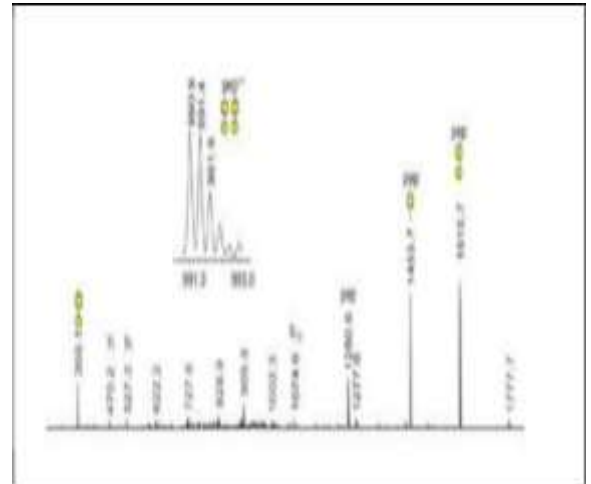
HASIL

1. SDS PAGE

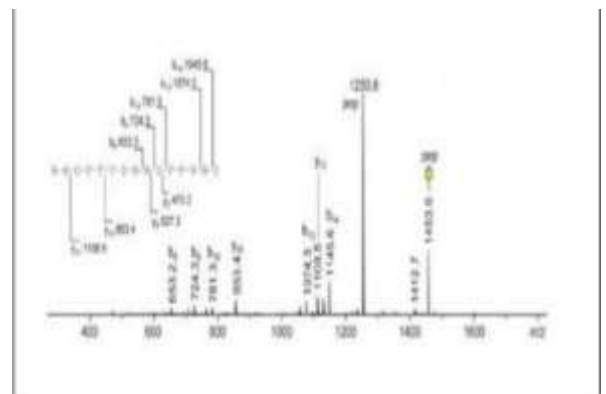


Gambar 1. Profil protein dalam dapar fosfat yang diekstraksi dari *K.pinnata* (Abhishek, *et al.* 2014)

2. LC-MS-MS



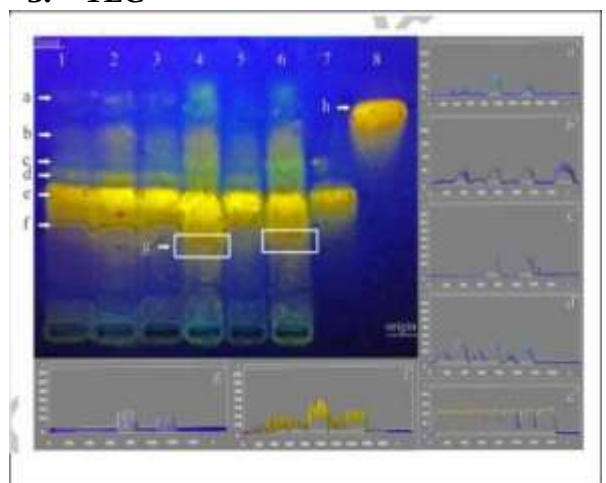
Gambar 2. Spektrum MS-MS sebesar 28.647 ion molekular



Gambar 3. Urutan turunan asam amino dari spektrum MS-MS

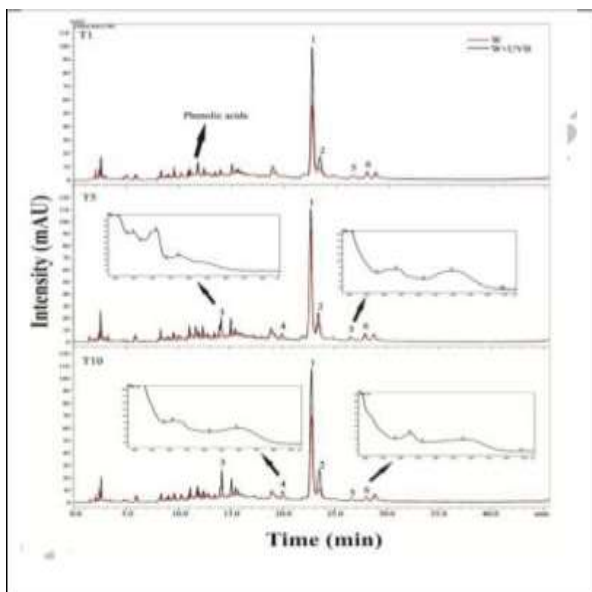
(Abhishek, *et al.* 2014).

3. TLC

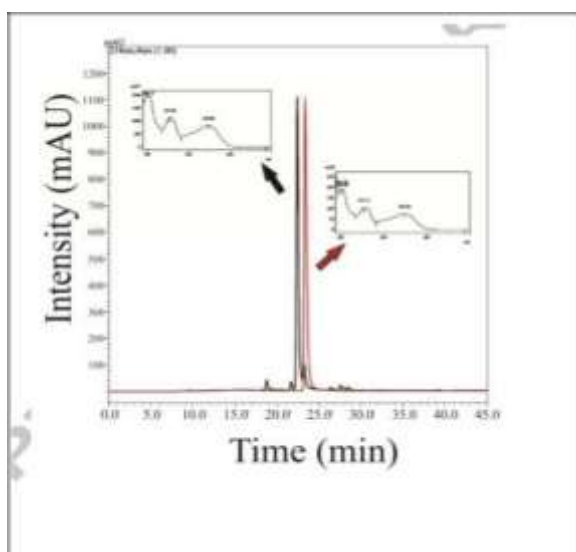


Gambar 4. Hasil TLC dari ekstrak *K. pinnata*. No 8 pada data TLC merupakan *quercitrin* (kontrol). (L.B. dos S.N *et al.*, 2015).

4. HPLC-DAD



Gambar 5. Kromatogram HPLC-DAD (254 nm) dan spektrum UV. Mayor flavonoid (MF) [*quercetin 3-O- α -L-arabinopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2) α -L-rhamnopyranoside*] – tR 22.7 min (1); *Quercitrin (quercetin 3-O-arhamnopyranoside)* – tR 23.4 min (2); tR = 14.1 min (3); Flavonoid – tR = 19.9 min (4); *4',5-dihydroxy-3',8-dimethoxyflavone 7-O- β -D-glucopyranoside* – tR 27.5 min (5); *Kaempferol 3-O- α -L-arabinopyranosyl (12)- α -L-rhamnopyranoside* – tR 28.6 min (6).

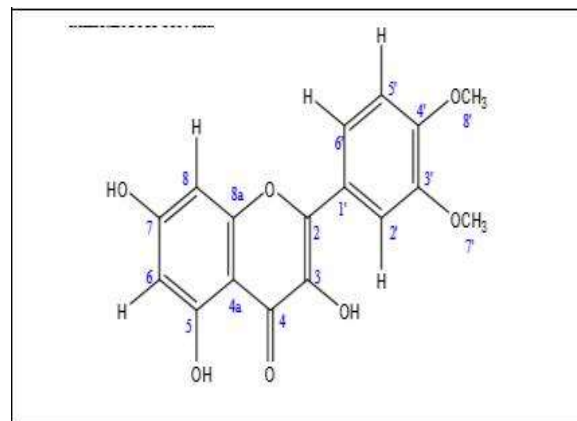


Gambar 6. Kromatogram HPLC-DAD (254 nm) and spectrum UV. Garis hitam: *quercetin 3-O- α -L-arabinopyranosyl(12)- α -L-*

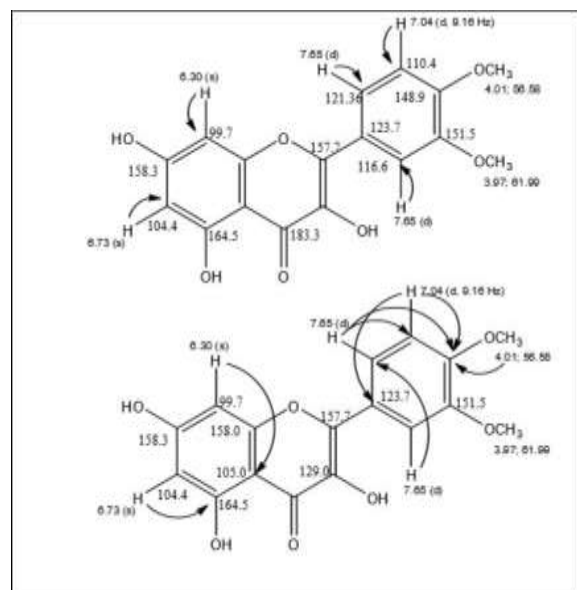
rhamnopyranoside (mayor flavonoid) dan garis merah: *quercitrin*.

(L.B. dos S.N *et al.*, 2015).

5. 1D-2D-NMR



Gambar 7. Struktur kimia senyawa A



Gambar 8. Korelasi HMQC dan HMBC senyawa A.

(Akhmad D., *et al.* 2013).

PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini, dilakukan pendataan tanggal serta perlakuan yang diberikan oleh tanaman. Hal ini diperlukan untuk menganalisa hasil analisis karena

setiap perbedaan tanggal dan perlakuan akan memberikan hasil analisa yang berbeda pula. Selain itu, proses aklimatisasi diperlukan agar tanaman yang diteliti tidak mengalami perubahan secara biologi dan kimiawi sehingga tidak mempengaruhi hasil penelitian.

SDS PAGE & LC-MS-MS

Pada tahap ekstraksi protein, digunakan reagen CHAPS. Reagen ini digunakan untuk meningkatkan kelarutan protein (Mechin V *et al.*, 2006). Selain itu, digunakan juga EDTA yang berperan sebagai *metalloprotease inhibitor* dengan mengkelat ion Ca^{2+} yang dibutuhkan pada pada adesi antar sel (Mechin V *et al.*, 2006; Simpson RJ *et al.*, 2002).

Hasil data berat molekul pada gambar 1. dapat dilihat bahwa ekstrak protein dari *K. pinnata* ada pada range 10 kDa sampai 30 kDa. Protein tidak terdeteksi pada berat molekul yang tinggi. Walaupun metode SDS PAGE terbatas dalam hal resolusi *band* protein jika dibandingkan dengan *2D-gel*, tetapi metode SDS PAGE dapat berguna dalam

analisis LC/MS/MS, dimana banyaknya protein dapat secara spesifik dianalisis (Abhishek, *et al.* 2014).

TLC

Analisis TLC ini menunjukkan bahwa daun *K. pinnata* sangat kaya akan senyawa fenolik dan flavonoid. Hal ini ditunjukkan dari hasil data bahwa mayor flavonoid (quercetin 3-O- α -L-arabinopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2) α -L-rhamnopyranoside) ditemukan diseluruh sampel ekstrak yang diteliti. Warna orange pada *band* diindikasikan adanya senyawa flavonoid yaitu *quercetin skeleton*. Hasil menunjukan bahwa hanya ekstrak dari no 4 dan 6 yang menunjukan *band* pada R_f 0,26, berwarna orange yang kemungkinan merupakan kuersetin (L.B. dos S.N *et al.*, 2015).

HPLC-DAD

Metode ini memfasilitasi analisis profil dari sampel yang fokus pada senyawa fenolik. Selain itu juga dari metode ini dapat dilakukan analisis kualitatif dan kuantitatif pada profil fenolik diantara seluruh sampel. Pada semua

sampel ditemukan senyawa flavonoid penting yaitu *quecitrin* (t_R 23,4 min) dan mayor flavonoid (t_R 22,7 min), tetapi pada setiap sampel memberikan jumlah yang berbeda. Hal ini dikarenakan perbedaan perlakuan cahaya yang diberikan pada proses penanaman masing-masing sampel (L.B. dos S.N *et al.*, 2015).

1D-2D-NMR

Berdasarkan data H-NMR menunjukkan bahwa senyawa A memiliki lima proton aromatik dan dua proton *double aromatic* dan dua *singlet methyl*. C-NMR menunjukan bahwa senyawa A memiliki 17 atom karbon, lima karbon metin, dan 10 karbon kuartener. Dengan spektrofotometri massa didapatkan berat molekul senyawa A yaitu sebesar 329,97 setara 330 m/z ($330,97 = M+H$). Berdasarkan data 1D-2D NMR dengan bantuan spektrofotometri massa dapat disimpulkan bahwa senyawa A merupakan senyawa flavonol yang bernama 3',4'-*dimethoxy quercetin* (Akhmad D., *et al.* 2013).

Dari keempat metode analisa diatas, terdapat kelebihan serta kelemahan dari setiap metode. Contoh perbandingan dari metode diatas yaitu *1D-2D-NMR* hanya bisa menghasilkan data dalam bentuk struktur senyawa atau dapat dikatakan hasil yang didapat berupa kualitatif, sedangkan *LC-MS-MS* dapat menentukan banyaknya protein yang spesifik dalam suatu sampel atau kuantitatif. Begitupula *TLC* hanya menghasilkan data berupa data kualitatif, sedangkan *HPLC-DAD* dapat menghasilkan data berupa kualitatif dan kuantitatif.

KESIMPULAN

Profiling kuersetin dapat dilakukan dengan menggunakan metode analisis berupa *SDS PAGE*, *LC-MS-MS*, *TLC*, *HPLC-DAD*, dan *1D-2D NMR*. Pemilihan metode dapat disesuaikan dengan kebutuhan analisis baik itu kualitatif maupun kuantitatif.

DAFTAR PUSTAKA

- Abhishek, *et al.* 2014. PROTEIN PROFILING OF *Bryophyllum Pinnatum* (LAM.) KURZ. LEAF. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* vol 6 Issue 1.
- Adinike K and Eretan OB. Purification and partial characterization of lectin from the fresh leaves of *Kalanchoe crenata* (And.) Haw. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 2004; 37:229–233.
- Akhmad D, *et al.* 2013. 3',4'-Dimethoxy Quercetin, a Flavonol Compound Isolated from *Kalanchoe pinnata*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* Vol. 3 (01), pp. 088-090.
- Chibueze, Nwose. 2013. Effect of Ethanolic Leaf Extract of *Kalanchoe pinnata* on Serum Creatine Kinase in Albino Rats. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* vol 1 Issue 5.
- D.A. Alabi, I.A. Oyero, Jimoh and N.A. Amusa. Fungitoxic and Phytotoxic Effect of *Vernonia amygdalina* (L), *Bryophyllum pinnatum* Kurz *Ocimum gratissimum* (Closium) L. and *Eucalyptna globules* (Caliptos) Labill Water Extracts on Cowpea and Cowpea Seedling Pathogens in Ago Iwoye, South Western Nigeria. *World Journal of Agricultural Sciences*. 2005,1(1): 70-75.
- De Padua LS, Lugod GC, and Pancho JV. 1983. *Handbook on Philippine Medicinal Plants* (Vol.2). Technical Bulletin. University of The Philippines at Los Banos. 3(3). page 32.
- E.E. Obaseiki-Ebor. Preliminary report on the invitro antibacterial activity of *Bryophyllum pinnatum* leaf juice. *Afr J Med Med Sci*. 1985,14(3-4):199-202.
- Gaind K and Gupta R. Alkanes, alkanols, triterpenes, and sterols of *Kalanchoe Pinnata*. *Phytochemistry* 1972; 11:1500-1502.

Gupta S, Banerjee R. Radical scavenging potential of phenolics from *B. pinnatum* (LAM.) OKEN. *Prep Biochem Biotechnol* 2011;41(3):305-19.

Hossan MS and Yemitan OK. Neuropharmacological effects of aqueous leaf extract of *Bryophyllum pinnatum* in Mice. *African Journal of Biomedical Research* 2009:101-107.

J.A.O. Ojewole. Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic effects of *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae) leaf aqueous extract. *Journal of Ethno pharmacology*. 2005,99: 13-19. 36.

Kanika P. Pharmacognostic and phytochemical evaluation of *Bryophyllum pinnatum* leaves. *Journal of Advance Science and Research* 2011;2(1):42-49.

L.B. dos Santos Nascimento, M.V. Leal-Costa, E.A. Menezes, V.R. Lopes, M.F. Muzitano, S.S. Costa, E.S. Tavares, Ultraviolet-B Radiation Effects on Phenolic Profile and

Flavonoid Content of *Kalanchoe pinnata*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (2015).

Liu KCS, Yang SL, Roberts MF and Phillipson JD. Eupafolin rhamnosides from *Kalanchoe gracilis*. *Journal of Natural Products* 1989; 52:970–974. *Materia Medika Indonesia Vol. 5.* 1989 page 290. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

Méchin V, Damerval C and Zivy M. Total protein extraction with TCA-acetone. In *Plant Proteomics: Methods and Protocols*, ed. H. Thiellement, M. Zivy, C. Damerval and V. Méchin, pp 1-8. Totowa: *Humana Press*, 2006.

Medicinal Herb Index in Indonesia (second edition). 1995. P.T. EISAI Indonesia. page 219.

Medicinal Plants in Hanoi, Vietnam. 1990. *WHO Regional Publications Western series No. 3*. Institute of *Materia Medica Hanoi*, page 35.

Okwu DE and Josiah C. Evaluation of the chemical composition of two Nigerian

- medicinal plants, *African Journal of Biotechnology* 2006;5(4):357-361.
- Ozolua RI, Eboka CJ, Duru CN, Uwaya DO. Effects of aqueous leaf extract of *B. pinnatum* on guinea pig tracheal ring contractility. *Niger J Physiol Sci* 2010;25(2):149-57.
- S. S. Costa, M. F. Muzitano, L. M. M. Camargo, M. A. S. Coutinho, Therapeutic potential of *Kalanchoe* species: flavonoids and other secondary metabolites, *Nat. Prod. Comm.* 3(12) (2008) 2151-2164.
- Sidhartha PA, Chandhuri KW. Anti-inflammatory action of *Bryophyllum pinnatum* leaf extract. *Fitoterapia* 1990; 41: 527-533.
- Simpson RJ, Ramsby ML and Makowski GS. *Preparation of cellular and subcellular extracts, In Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual.* ed. RJ Simpson. pp 91-142. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.
- Supratman, U., T. Fujita, K. Akiyaa, H. Hayashi and A. Murkami et al., Anti-tumor promoting activity of bufadienolides from *Kalanchoe pinnata* and *K. daigremontiana* X *tubiflora*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2001,65: 947-949.
- Yemitan OK, Salahdeen HM. Neurosedative and muscle relaxant activities of aqueous extract of *B. pinnatum*. *Fitoterapia* 2005;76:187-93.