

**BIDANG ILMU : MIPA
GIZI & PENYAKIT TROPIS**

kt
kkr
LD. 34/11
amf
P

**LAPORAN
HIBAH PENELITIAN UNGGULAN STRATEGIS NASIONAL
TAHUN ANGGARAN 2009**



**POTENSI ANGGUR LOKAL
SEBAGAI BAHAN ANTIOKSIDAN DAN ANTIKANKER**

**Dr. Nanik Siti Aminah, M.Si.
Dr. Alfinda Novi Kristanti, DEA.
Prof. Dr. Sukardiman Harjotaruno, M.Si., Apt.**

**Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2009, Sesuai dengan
Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Strategis Nasional
Nomor: 319/H3.13/PPd/2009, Tanggal 16 Pebruari 2009**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
Nopember 2009**

HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR

1. Judul Penelitian : Potensi Anggur Lokal Sebagai Bahan Antioksidan dan Antikanker

2. Ketua Peneliti

a. Nama Lengkap : Dr. Nanik Siti Aminah, M.Si.
 b. Jenis Kelamin : Perempuan
 c. NIP : 131932689
 d. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
 e. Jabatan struktural : -
 f. Bidang Keahlian : Kimia organik Bahan Alam
 g. Fakultas /Jurusan : Sains dan Teknologi/Kimia
 h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
 i. Tim Peneliti :

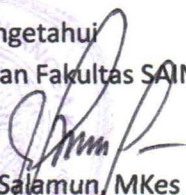
No	Nama	Bidang Keahlian	Fakultas/Jurusan	Perguruan Tinggi
1	Dr. Nanik Siti Aminah, M.Si.	Kimia organik Bahan Alam	Saintek/Kimia	UNAIR
2	Dr. Alfinda Novi Kristanti, DEA.	Kimia organik Bahan Alam	Saintek/Kimia	UNAIR
3	Prof. Dr. Sukardiman, M.Si., Apt.	Farmakognosi	Farmasi	UNAIR

3. Pendanaan dan Jangka Waktu Penelitian

a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 1 tahun
 b. Biaya total yang diusulkan : Rp 100.000.000
 c. Biaya yang disetujui Tahun 2009 : Rp 100.000.000

Surabaya, 9 Nopember 2009

Mengetahui
 Dekan Fakultas SAINTEK-UNAIR,


Drs. Salamun, MKes

NIP. 131 696 506

Ketua Peneliti,


Dr. Nanik Siti Aminah, M.Si.

NIP. 131932689

Menyetujui
 Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat


Dr. Bambang Sektiari Lukiswanto, DEA., drh.

NIP. 131 837 004

RINGKASAN

Anggur lokal Indonesia yang lebih dikenal sebagai anggur Probolinggo (*Vitis labrusca*) sampai saat ini pemanfaatannya masih sangat terbatas, yaitu sebagai buah segar. Namun begitu, buah segar inipun masih kalah populer dibanding buah anggur impor (*Vitis vinifera*), baik dari segi harga maupun rasanya. Hal ini disebabkan anggur lokal memiliki kulit yang tebal dan rasa yang masam, sehingga kurang disukai (Kompas, 25 November 2004). Spesies ini bersama-sama dengan *Vitis vinifera* berada dalam genus *Vitis* dan famili Vitaceae.

Vitis vinifera telah dilaporkan dalam berbagai literatur sebagai salah satu sumber utama senyawa turunan resveratrol dan oligoresveratrol. Senyawa tersebut merupakan senyawa metabolit sekunder golongan fenolik yang dilaporkan memiliki berbagai aktivitas biologi yang sangat bermanfaat, seperti antioksidan (Goldberg, 1996), antikanker (Jang, 1997), anti-HIV (Dai, 1998), antibakteri (Sultanbawa, 1987; Geewananda, 1986), antifungal (Pryce, 1977; Bokel, 1988), antihepatotoksik (Oshima, 1993), antiinflamasi (Kitanaka, 1990), dan lain-lain. Karena kekerabatannya yang dekat dengan *Vitis vinifera*, diharapkan anggur lokal (*V. labrusca*) akan memiliki senyawa kimia yang sejenis ataupun mungkin akan diperoleh senyawa yang baru dengan aktivitas yang menarik pula.

Oleh karena itu pada penelitian ini bertujuan untuk melakukan eksplorasi senyawa metabolit sekunder dari buah anggur lokal dan uji aktivitas antikanker serta antioksidan terhadap ekstrak dan senyawa isolat murni yang diperoleh. Sehingga akan dapat direkomendasikan pemanfaatan anggur lokal yang lebih luas selain sebagai buah segar, misalnya sebagai bahan makanan sehat (health food) atau obat-obatan alami.

Uji antikanker dalam penelitian ini diawali dengan skrining terhadap ekstrak menggunakan uji BSLT (Brine Shrimp Lethality Test) menggunakan benur udang *Artemia*

alina. Selanjutnya terhadap ekstrak juga digunakan uji induksi apoptosis karena obat kemoterapi kanker yang memiliki mekanisme kematian sel secara apoptosis memiliki beberapa keuntungan dalam implementasi kliniknya selain tidak menyebabkan efek samping juga menunjukkan efek kemoterapi dan dapat memiliki efek kemopreventif (Hsiang, *et al.* 1989). Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode spektroskopi sengan pereaksi Difenil pikril hidrazil (DPPH).

Proses ekstraksi terhadap cairan buah anggur local segar menghasilka ekstrak n-heksan, kloroform, etil asetat, dan methanol sisa berturut-turut : 3 g (0,03%), 18 g 0,18%), 31 g (0,31%), dan 250 g (2,5%). Sedangkan dari ampasnya diperoleh ekstrak metanol = 8 g (8%), n-heksan = 100 mg (0,1%), kloroform = 2,5 g (2,5%), etil asetat = 3 g (3%), dan methanol-air sisa = 2 g (2%). Ekstrak kloroform dan metanol sisa dari ampas anggur, serta campuran senyawa hasil hidrolisis ekstrak metanol air cairan buah anggur memberikan nilai IC_{50} yang lebih kuat dibanding vitamin C yang digunakan sebagai kontrol positif. Sedangkan ekstrak kloroform dari ampas serta ekstrak n-heksan, kloroform, dan campuran kloroform etil asetat dari cairan buah anggur local memiliki aktivitas antioksidan yang lebih rendah disbanding vitamin C.

Ekstrak etil asetat ampas anggur lokal mempunyai aktivitas antioksidan yang paling tinggi dibanding dibanding ekstrak yang lain. Namun dua buah ekstrak yaitu ekstrak etil asetat dan metanol air sisa dari cairan buah anggur lokal tidak aktif ($IC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$).

Sebanyak lima buah senyawa fenolik isolat murni telah diperoleh dari proses isolasi dan pemurnian terhadap ekstrak kloroform, etil asetat, dan hasil hidrolisis dari ekstrak metanol air cairan buah anggur segar. Tiga buah senyawa isolat murni (isolat 1, $IC_{50} = 72,9 \mu\text{g/mL}$; isolat 3/resveratrol, $IC_{50} < 5 \mu\text{g/mL}$, dan isolat 4, $IC_{50} = 487,8 \mu\text{g/mL}$) dari empat isolat yang diuji

menunjukkan aktivitas antioksidan. Senyawa isolat 3 (resveratrol) mempunyai aktivitas antioksidan yang paling tinggi dibanding isolat murni yang lain.

Ekstrak n-heksan, kloroform, etil asetat, campuran kloroform-etil asetat, dan metanol sisa dari cairan buah anggur local segar aktif terhadap uji skrining antikanker dengan BSLT ($LC_{50} < 1000$ ppm). Berdasarkan hasil uji antikanker dengan kultur sel kanker HeLa (sel kanker servik manusia) pada inkubasi 24 jam diperoleh hasil IC_{50} untuk ekstrak heksan sebesar $759 \mu\text{g/ml}$ dan ekstrak campuran kloroform dan etil asetat $1072 \mu\text{g/ml}$, sedangkan untuk ekstrak yang lain tidak dapat ditentukan harga IC_{50} . Berbeda dengan hasil uji antikanker pada inkubasi 24 jam, ternyata pada uji antikanker dengan sel kanker HeLa dengan inkubasi 48 jam terlihat harga IC_{50} ekstrak air adalah $1487,47 \mu\text{g/ml}$, IC_{50} ekstrak heksan adalah $417,30 \mu\text{g/ml}$, IC_{50} ekstrak etil asetat adalah $537,31 \mu\text{g/ml}$ dan IC_{50} campuran ekstrak kloroform - etil asetat adalah $473,72 \mu\text{g/ml}$, sedangkan ekstrak kloroform tidak bisa ditentukan harga IC_{50} nya. Harga IC_{50} tersebut cukup besar sehingga ekstrak heksan dan campuran ekstrak kloroform dan etil asetat dapat dikatakan bahwa ekstrak tersebut kurang poten terhadap sel kanker HeLa. Menurut NCI (National Cancer Institute) suatu ekstrak dikatakan poten sebagai antikanker jika harga $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/ml}$.

SUMMARY

The Indonesian local grape, known as "Anggur Probolinggo" (*Vitis labrusca*) until now the utilization is still very limited, that is as fresh fruit. However, this fresh fruit is still less popular than imported grapes (*Vitis vinifera*), both in terms of price and taste. This is because the local grape has a thick skin and sour taste, making it less desirable (Kompas, 25 November 2004). This species (*Vitis labrusca*) together with *Vitis vinifera* belong to the *Vitis* genus in the Vitaceae family.

Vitis Vinifera reported in the literature as one of the main sources of resveratrol and derived oligoresveratrol compounds. These compounds are a group of secondary metabolites compounds, especially phenolic compounds that reported various beneficial biological activities, such as antioxidants (Goldberg, 1996), Anticancer (Jang, 1997), anti-HIV (Dai, 1998), antibacterial (Sultanbawa, 1987; Geewananda, 1986) , antifungal (Pryce, 1977; Bokel, 1988), antihepatotoxic (Oshima, 1993), antiinflammatory (Kitanaka, 1990), and others. Because close to *Vitis vinifera* species, local grape which is expected *Vitis labrusca* will have a similar chemical compound or novel compounds can be obtained with exciting activities as well.

The aims of this research to explore secondary metabolites compounds from the local grape and also to know the anticancer and antioxidant activity of the extracts and pure compounds. So the result of this research would recommend the use of local grape which is broader than as fresh fruit, such as healthy foods or natural materials.

The Anticancer test in this study started with the screening of extracts using BSLT test (Brine Shrimp Lethality Test) by *Artemia salina* shrimp. Further tests were also used to the extract the induction of apoptosis by cancer chemotherapy drugs that have mechanisms of

apoptotic cell death has several advantages in conducting clinics in addition to not causing side effects of chemotherapy and also shows the effect could have the effect chemopreventif (Hsiang, et al. 1989). The antioxidant activity test using spectroscopic methods with Diphenyl picrylhydrazil (DPPH) as reagent.

The extraction process of juice of fresh local grape produce n-hexane, chloroform, ethyl acetate, and remaining methanol rows extracts: 3 g (0.03%), 18 g 0.18%), 31 g (0.31%), and 250 g (2.5%). While the residue of local grape (waste of juice) resulting the methanol extract = 8 g (8%), n-hexane extract = 100 mg (0.1%), chloroform extract = 2.5 g (2.5%), ethyl acetate extract = 3 g (3%) , and methanol-water remaining extract = 2 g (2%). Chloroform and methanol extracts from the local grape solid (waste of juice), and a mixture of compounds from the hydrolysis of liquid methanol extract of the local grape fruit gave IC_{50} values more powerful than vitamin C which is used as a positive control. Whereas the chloroform extract of the residue and extract n-hexane, chloroform, ethyl acetate and a mixture of chloroform of juice of fresh local grape has a lower antioxidant activity than vitamin C.

The ethyl acetate extract from the residue of local grape (waste of juice) has higher antioxidant activity compared with other extracts. However, the two extracts (ethyl acetate and methanol extracts) from the liquid of the local grape juice is not active ($IC_{50} > 500$ tg / mL).

Five pure phenolic compounds have been resulted from isolation and purification process from the extract of chloroform, ethyl acetate, and the results of hydrolysis of methanol extracts of liquid fresh grapes. Three pure isolated compounds (compound 1, $IC_{50} = 72.9$ tg / mL; compound 3/resveratrol, $IC_{50} < 5\mu\text{g/mL}$, and four isolates, $IC_{50} = 487.8$ tg / mL) from four isolated compound tested showed antioxidant activity. Compound 3 (resveratrol) has the highest antioxidant activity compared to the other pure isolated compounds.

N-hexane, chloroform, ethyl acetate, a mixture of chloroform-ethyl acetate, and remaining of methanol extracts from local fresh grapes fruit active against anticancer screening tests with BSLT ($LC_{50} < 1000$ ppm). Based on the test results with the culture of cancer cells to anticancer HeLa (human cervical cancer cells) at 24 hours of incubation, IC_{50} was obtained for hexane at $759 \mu\text{g} / \text{mL}$ and the extract mixture of chloroform and ethyl acetate $1072 \mu\text{g} / \text{mL}$, whereas for the other extracts can not be determined IC_{50} . In contrast to anti-cancer tests on 24-hour incubation, turns on anticancer test with HeLa cancer cells with IC_{50} of 48-hour incubation extract water looks $1487.47 \mu\text{g} / \text{mL}$, hexane IC_{50} was $417.30 \mu\text{g} / \text{mL}$, ethyl acetate extract IC_{50} $537,31 \mu\text{g} / \text{mL}$ and IC_{50} mixture of chloroform - ethyl acetate is $473.72 \mu\text{g} / \text{mL}$, whereas the chloroform extract them can not be determined IC_{50} .

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT sehingga penelitian Strategis Nasional tahun 2009 dengan judul Potensi Anggur Lokal Sebagai Bahan Antioksidan dan Antikanker ini dapat diselesaikan tepat waktu.

Pada kesempatan ini seluruh team peneliti mengucapkan terimakasih kepada : Kepala LPPM Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian ini, Dekan Fakultas Sains dan Teknologi dan Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah mengizinkan pelaksanaan penelitian laboratorium kedua fakultas ini. Dekan Faculty of Pharmacy, Meijo University, Nagoya Japan atas ijinnya untuk melaksanakan penelitian di laboratorium Natural product resources, Prof. Masatake Niwa dan Dr. Yoshiaki Takaya yang banyak membantu dalam penyelesaian penelitian ini.

Besar harapan kami agar hasil penelitian ini bermanfaat bagi perkembangan ilmu kimia bahan alam maupun ilmu terapan terutama di bidang pengembangan sumber daya alam dan kesehatan.

Akhirnya, team peneliti menyadari bahwa penelitian ini masih perlu banyak pengembangan kedepan, untuk itu kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan.

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PENGESAHAN	i
RINGKASAN	ii
SUMMARY	v
PRAKATA	viii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1. Antioksidan	3
2.2. Antikanker	5
2.3 Anggur Lokal	7
2.4. <i>Vitis labrusca</i> dan <i>Vitis vinifera</i>	8
2.5. Senyawa Metabolit Sekunder pada Genus <i>Vitis</i>	9
2.6. Aktivitas Biologi Senyawa Turunan Resveratrol dan Oligoresveratrol	14
BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	15
3.1. Tujuan Penelitian	15
3.1.1. Tujuan umum	15
3.1.2. Tujuan khusus	15
3.1. Manfaat Penelitian	16
BAB IV METODE PENELITIAN	18
4.1. Alur Penelitian	18

	Halaman
4.2 Tempat Penelitian	19
4.3.1 Bahan penelitian	19
4.3.2 Bahan kimia	19
4.3.3 Alat-alat penelitian	20
4.4 Prosedur Kerja	20
4.4.1. Pembuatan ekstrak buah anggur	20
4.4.2. Hidrolisis ekstrak MeOH-H ₂ O-cairan	22
4.4.3. Uji kromatografi lapis tipis (KLT) dan HPLC masing-masing ekstrak dan isolat murni	22
4.4.4. Pemisahan dan pemurnian senyawa dari ekstrak kloroform cairan dan ekstrak etil asetat cairan dengan HPLC preparatif	23
4.4.5. Pemisahan dan pemurnian senyawa hasil hidrolis ekstrak MeOH-H ₂ O-cairan	24
4.4.6. Analisis NMR isolat murni	24
4.4.7. Uji aktivitas antioksidan ekstrak dan isolat murni	24
4.4.8. Uji BSLT (Brine Shrimp Lethality test) terhadap ekstrak	30
4.4.9. Uji antikanker terhadap ekstrak	30
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	32
5.1. Penyiapan Sampel	32
5.2. Pembuatan ekstrak buah anggur	33
5.3. Hidrolisis Ekstrak MeOH-H ₂ O-cairan	34

	Halaman
4. Isolasi Senyawa Hasil Hidrolisis	36
4. Isolasi Senyawa dari Ekstrak Kloroform dan Etil Asetat Cairan Anggur Segar	37
5.5. Analisis Senyawa Hasil Isolasi/ Isolat murni	38
5.6. Uji aktivitas antioksidan ekstrak dan isolat murni	39
5.7. Uji Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) ekstrak cairan anggur	43
5.8. Uji Aktivitas Antikanker Menggunakan Kultur sel kanker HeLa (sek kanker servik manusia)	45
BAB VI KESIMPULAN	48
DAFTAR PUSTAKA	50

DAFTAR TABEL

	halaman
Tabel 2.1. Senyawa oligoresveratrol pada genus <i>Vitis</i> dan distribusinya	11
Tabel 2.2. Aktivitas biologi beberapa senyawa turunan resveratrol dan oligoresveratrol	14
Tabel 5.1. Data hasil Uji aktivitas antioksidan dari seluruh ekstrak dan isolat murni dari buah anggur lokal.	41
Tabel 5.2. Data hasil Uji BSLT terhadap ekstrak cairan anggur lokal	44
Tabel 5.3. Hasil Uji Aktivitas Antikanker dari Beberapa Ekstrak Anggur Lokal terhadap Sel Kanker HeLa dengan waktu inkubasi 24 jam	45

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Absorbansi pada spektrum UV dari radikal DPPH (Z; warna violet) dan non radikal DPPH (ZH, warna kuning)	4
Gambar 2.2. Struktur beberapa senyawa turunan resveratrol dan oligoresveratrol pada genus <i>Vitis</i>	12
Gambar 2.3. Struktur beberapa senyawa golongan fenolik lain pada genus <i>Vitis</i>	13
Gambar 4.1. Tabung reaksi dibungkus dengan aluminium foil, untuk menghindari adanya pengaruh sinar UV terhadap DPPH	27
Gambar 5.1. Buah anggur segar di pasar Sepanjang, Taman, Sidoarjo	32
Gambar 5.2. (a) buah anggur segar yang diperoleh langsung dari pasar, (b) Buah anggur terseleksi, (c) tangkai buah anggur (d) buah anggur dalam proses penghalusan dengan blender (e) ampas buah anggur (f) cairan buah anggur segar yang telah dipisahkan dari ampasnya	33
Gambar 5.3. Kromatogram TLC (a) sebelum hidrolisis (b) setelah hidrolisis, tanda panah ekstrak sebelum hidrolisis	36
Gambar 5.4. Kromatogram proses pemisahan dan pemurnian untuk mendapatkan isolat murni murni	37
Gambar 5.5. Kromatogram pemisahan/pemurnian isolate 4 dari ekstrak kloroform (a) dan isolate 5 dari ekstrak etil asetat cairan buah anggur	38
Gambar 5.6. Perubahan warna DPPH dari violet menjadi warna kuning oleh senyawa antioksidan	39
Gambar 5.7. Perubahan warna DPPH yang terjadi pada uji aktivitas antioksidan dengan perubahan konsentrasi pada larutan uji.	40
Gambar 5.8. Grafik aktivitas antioksidan isolat murni dari cairan buah anggur local	42
Gambar 5.9. Grafik aktivitas antioksidan ekstrak-ekstrak dari cairan buah anggur lokal	42
Gambar 5.10. Grafik aktivitas antioksidan ekstrak-ekstrak dari ampas buah anggur lokal	43
Gambar 5.11. Grafik aktivitas antioksidan ekstrak-ekstrak dari ampas buah anggur lokal	44

dimilikinya. Disamping itu juga akan diperoleh informasi tentang aktivitas antikanker dan antioksidan ekstrak buah anggur. Berdasarkan data yang diperoleh ini akan dapat direkomendasikan pemanfaatan anggur lokal yang lebih luas selain sebagai buah segar, misalnya sebagai bahan makanan sehat (health food) atau obat-obatan alami.

Uji antikanker dalam penelitian ini diawali dengan skrining terhadap ekstrak menggunakan uji BSLT (Brine Shrimp Lethality Test) menggunakan benur udang *Artemia salina*. Selanjutnya terhadap ekstrak juga digunakan uji induksi apoptosis karena obat kemoterapi kanker yang memiliki mekanisme kematian sel secara apoptosis memiliki beberapa keuntungan dalam implementasi kliniknya selain tidak menyebabkan efek samping juga menunjukkan efek kemoterapi dan dapat memiliki efek kemopreventif (Hsiang, *et al.* 1989). Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode spektroskopi dengan pereaksi Difenil pikril hidrazil (DPPH).

BAB II

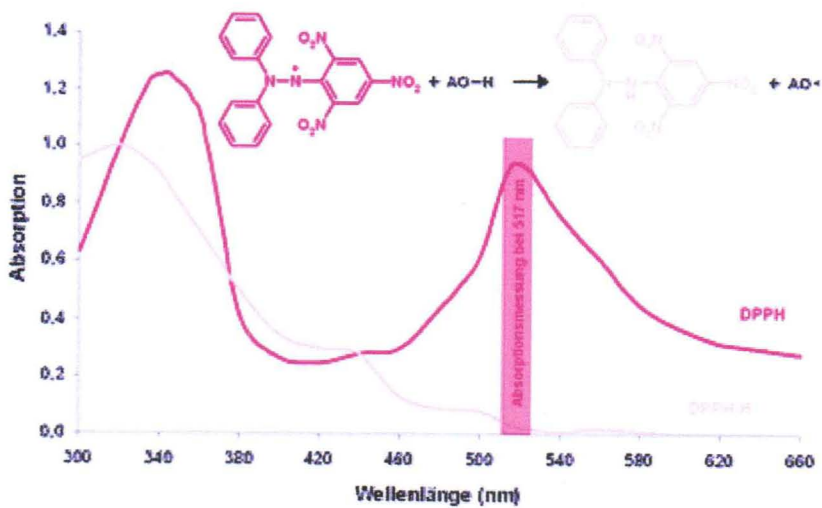
TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Antioksidan

Antioksidan adalah suatu zat yang mudah teroksidasi dan mampu menunda atau mencegah terjadinya oksidasi substrat serta dapat bersifat sebagai penangkal radikal bebas, atau penghambat elektron (Cuendet, 1997). Antioksidan ada dua jenis yaitu antioksidan alami dan sintetik. Antioksidan alami misalnya likopene, lutein, vitamin C, vitamin E, β karoten, flavonoid, terpen laktone dan antrakuinon (Gonda, 2000; Panichayupakaranant, 2004). Sedangkan antioksidan sintetik misalnya asam tiobarbiturat (TBA), butil hidroksitoluen (BHT), butil hidroksi anisol (BHA), dan t-butylhidroquinon (TBHQ) (Haraguchi, 1996; Panichayupakaranant, 2004).

Tumbuh-tumbuhan menghasilkan berbagai senyawa metabolit sekunder, yang beberapa diantaranya memiliki aktivitas antioksidan. Senyawa-senyawa metabolit sekunder tersebut diantaranya adalah vitamin, senyawa golongan fenolik, karotenoid, dan flavonoid. Senyawa golongan flavonoid kelompok flavon, isoflavon, flavanon, flavonol, antosianin, dan katecin dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan yang kuat (Pastrana-Bonilla, 2003). Disamping itu senyawa turunan resveratrol dan oligoresveratrol merupakan senyawa bahan alam yang mempunyai aktivitas biologis sebagai antiradikal bebas yang dapat menangkap senyawa oksigen reaktif. Aktivitas antiradikal bebas akan menurun atau tidak aktif sama sekali bila gugus hidroksi disubstitusi oleh gugus metil, metoksi maupun gugus lain. Semakin banyak gugus hidroksi maka semakin meningkat aktivitas antiradikal bebasnya (Cos, 1998).

Metode yang digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan adalah dengan mengukur aktivitas penangkapan radikal bebas dari DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (1). DPPH merupakan radikal bebas yang stabil dengan delokalisasi elektron yang berlebih. Delokalisasi ini meningkatkan warna violet dan absorbansi dalam etanol sekitar 517 nm. Ketika DPPH bersama dengan senyawa lain yang siap memberikan atom hidrogen, maka akan terbentuk DPPH non radikal (2,2-difenil-1-pikrilhidrazin) (2), ditandai dengan hilangnya warna violet menjadi kuning pucat dari pikril yang masih ada (Molyneux, 2004).



Gambar 2.1. Absorbansi pada spektrum UV dari radikal DPPH (Z, warna violet) dan non radikal DPPH (ZH, warna kuning)

Reaksi antara DPPH radikal (Z[•]) dengan senyawa pendonor hidrogen (AH) :

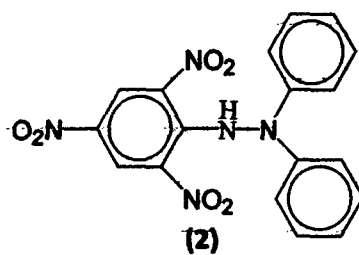
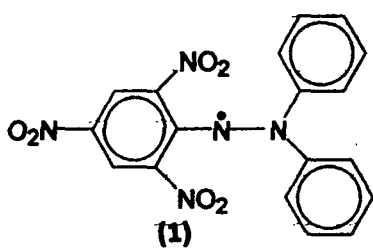


DPPH radikal (Z^{\bullet}) bereaksi dengan senyawa pendonor hidrogen menghasilkan DPPH non radikal (ZH) dan terbentuk radikal bebas baru (A^{\bullet}). Radikal ini akan mengalami reaksi lebih lanjut dan mengendalikan keseluruhan stoikiometri. Radikal A^{\bullet} akan mengalami reaksi berantai dan akan membentuk senyawa A-A.

Parameter yang digunakan untuk uji ini yaitu IC_{50} (Inhibitor Concentration yang memberi efek 50%). Absorbansinya diukur pada panjang gelombang 517 nm. Perhitungan kapasitas antioksidan sebagai prosen peredaman absorbans menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Peredaman} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel setelah inkubasi}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Analisis data daya hambat IC_{50} (Inhibitor Concentration 50%) ditentukan berdasarkan analisis regresi linier % peredaman DPPH terhadap konsentrasi senyawa. Jika $IC_{50} < 1000$ ppm maka senyawa tersebut mempunyai aktivitas sebagai antioksidan (Cos, 1998). Struktur DPPH adalah sebagai berikut :

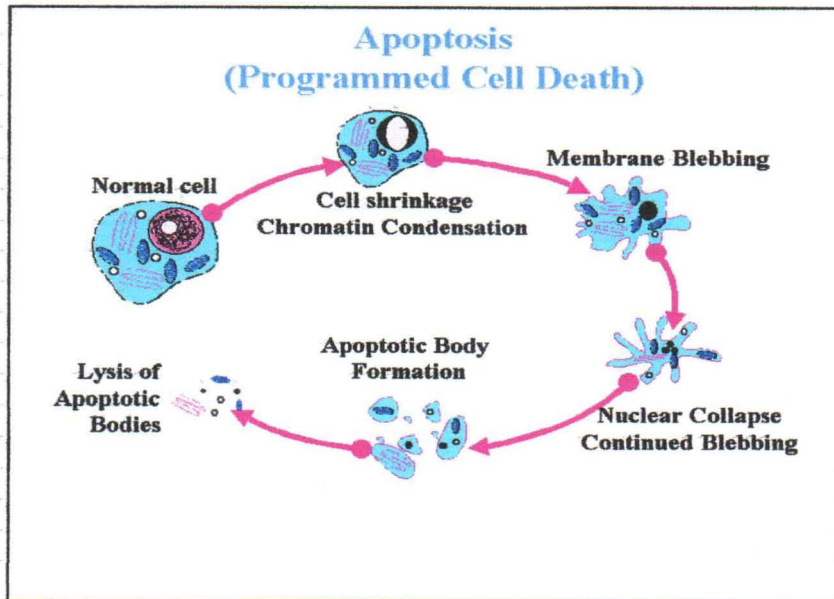


2.2. Antikanker

Kanker terjadi karena adanya perubahan mendasar dalam fisiologi sel yang akhirnya tumbuh menjadi malignan serta mempunyai ciri-ciri umum sebagai berikut : (1) mandiri dalam

gnal pertumbuhan, (2) tidak peka terhadap signal antipertumbuhan, (3) menghindari apoptosis, (4) memiliki potensi replikasi yang tidak terbatas, (5) angiogenesis, (6) invasi dan metastase ke jaringan lain (Manahan dan Wierberg, 2000). Oleh karena itu target pengembangan obat antikanker diarahkan pada induksi (pemicuan) apoptosis (Fisher, 1994), penghambatan angiogenesis terutama untuk kanker solid seperti kanker payudara (Keshet and Sasson, 1999; Lianguo *et al.*, 2002), faktor pertumbuhan dan *growth factor signaling* (Gibbs, 2000), *regulasi cell cycle dan checkpoint control* (Saphiro and Harper, 1999).

Apoptosis merupakan program bunuh diri dari sebuah sel. Program ini memiliki peran yang penting untuk menjaga homeostatis perkembangan – biakan sel dan dengan adanya disregulasinya bisa berakibat timbulnya macam-macam penyakit (Evan dan Littlewood, 1998). Salah satu peran pentingnya adalah untuk membatasi proliferasi sel yang tidak diperlukan yang sekiranya akan dapat menyebabkan kanker. Pada sel-sel kanker program apoptosis ini telah mengalami gangguan sehingga sel akan mengalami metastasis (Peter *et al.*, 1997). Apoptosis dapat diamati pada penampakan fisiologis, antara lain berupa pengerutan sel, kerusakan pada plasma membran dan adanya kondensasi kromatin. Tidak seperti pada nekrosis sel, sel-sel yang mengalami apoptosis tidak kehilangan kandungan internal sel dan tidak menyebabkan respon inflamasi. Bila program apoptosis telah selesai pada sebuah sel maka akan meninggalkan kepingan sel mati yang disebut badan apoptosis yang akan dikenali oleh sel makrofag dan dimakan (*engulfed*) (Peter *et al.*, 1997). Obat kemoterapi kanker yang memiliki mekanisme kematian sel secara apoptosis maka memiliki beberapa keuntungan dalam implementasi kliniknya selain tidak menyebabkan efek samping juga menunjukkan efek kemoterapi dan dapat memiliki efek kemopreventif (Hsiang, *et al.* 1989).



2.3. Anggur Lokal

Selain dikenal sebagai Kota Angin dan Kota Mangga, dulu Probolinggo juga dikenal sebagai Kota Anggur. Sekitar dekade 80-an, budidaya anggur ini sempat booming di Kota Probolinggo. Saking maraknya, di sepanjang Jl Mastrip Desa Wonoasih-sentra anggur terbesar di Kota Probolinggo-ribuan pohon anggur terbentang sejauh mata memandang. Di kiri kanan jalan, buah anggur itu terjuntai mempesona di antara para-para bambu yang menopangnya. Anggur-anggur itu menggoda setiap insan yang melihatnya, untuk segera memetikanya dan kemudian mencicipinya. Namun kedaan ini saat ini budidaya anggur sudah sangat jauh berkurang (kompas, 28-06-2001).

Tanaman anggur Anggur (*Vitis sp*) bukan asli Probolinggo, tetapi merupakan tanaman introduksi yang sudah beradaptasi dalam kurun waktu yang sangat lama. Terdapat dua jenis anggur yang ditanam di wilayah Probolinggo, yaitu *Vitis vinifera* dan *Vitis labrusca* dengan berbagai varietas. Di Probolinggo juga terdapat satu-satunya kebun percobaan anggur di

Indonesia (berdiri tahun 1955). Saat ini di kebun percobaan anggur Probolinggo tepatnya di desa Banjarsari, kecamatan Probolinggo, memiliki kebun seluas 5 hektar yang ditanami 37 varietas anggur dari dua spesies, yaitu *Vitis vinifera* (26 varietas) dan *Vitis labrusca* (11 varietas) (Heyne, 1986 dan Loraine, 2006). Baik kebun percobaan anggur Banjarsari, maupun petani anggur di wilayah Probolinggo, saat ini hanya memanfaatkan pohon anggur sebagai buah segar. Namun buah segar inipun masih kalah populer dibanding buah anggur import, sehingga masyarakat mengeluhkan sulitnya pemasaran buah anggur Probolinggo.

2.4. *Vitis labrusca* dan *Vitis vinifera*

Vitis vinifera dan *Vitis labrusca*, termasuk dalam genus *Vitis* dan genus ini merupakan salah satu genus dari tumbuhan famili Vitaceae. Tumbuhan ini mempunyai nilai ekonomi yang tinggi, karena menghasilkan buah anggur yang dapat dikonsumsi secara langsung sebagai buah-buahan, diperas dan difermentasi untuk menghasilkan minuman yang dikenal dengan wine, ataupun dibuat sebagai bahan selai (Kompas, 26 Maret 2004).

Vitis vinifera mempunyai ciri-ciri: kulit tipis, rasa manis dan segar. Tanaman ini mempunyai kemampuan tumbuh dari dataran rendah hingga 300 m dari permukaan laut dan beriklim kering. Beberapa varietas *Vitis vinifera* yang populer di wilayah Probolinggo adalah Gros Colman, Probolinggo biru dan putih, Situbondo Kuning, Alphonso lavelle, dan Golden Champion. Karena rasanya yang manis dan segar *Vitis vinifera* lebih disukai oleh konsumen (Kompas, 26 Maret 2004, Loraine, 2006).

Vitis labrusca mempunyai ciri-ciri: kulit tebal, rasa masam, dan kurang segar. Tanaman ini mempunyai kemampuan tumbuh dari dataran rendah hingga 900 m dari permukaan laut. Varietas Banyuwangi hitam, Tegal hitam, Delaware, Brilliant, Carman, dll termasuk dalam jenis

Vitis labrusca. Karena rasanya yang masam buah anggur dari jenis ini kurang disukai dan mempunyai nilai ekonomi yang lebih rendah. Namun karena jenis ini mempunyai ketahanan hidup lebih tinggi, beberapa petani di Probolinggo masih bertahan untuk menanamnya (Kompas, 26 Maret 2004, Loraine, 2006).

2.5. Senyawa Metabolit Sekunder pada Genus *Vitis*

Resveratrol (3,5,4'-trihidroksi-trans-stilben) yang merupakan senyawa utama dari tumbuhan anggur, pertama kali diisolasi sebagai fitoaleksin dari daun anggur (*Vitis vinifera* L.) pada tahun 1977. Pada penelitian selanjutnya, senyawa ini ternyata juga terdapat pada kulit anggur (*Vitis vinifera* L.) dan minuman beralkohol/wine hasil fermentasi dari buah tersebut. Disamping itu senyawa resveratrol dan turunannya juga dilaporkan pada wine dan kultur sel dari *V. vinifera* (Takaya, 2001).

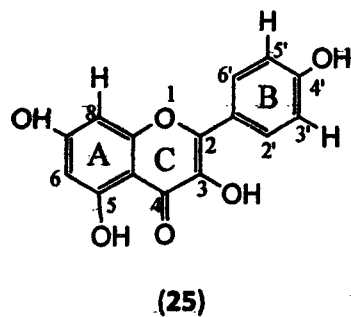
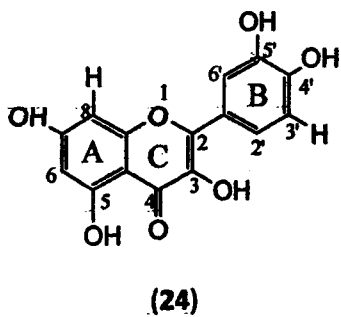
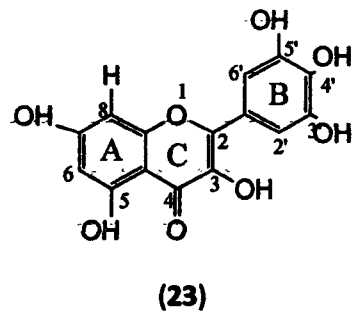
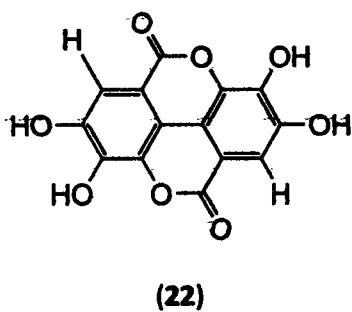
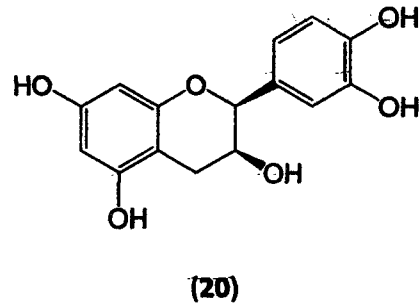
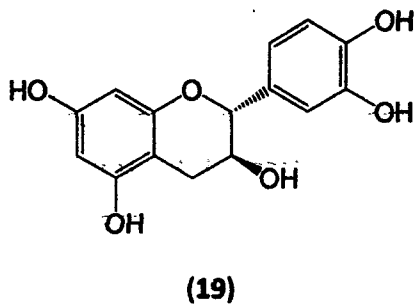
Resveratrol adalah senyawa golongan stilben yang memiliki 3 gugus hidroksi pada posisi 3,5,4' (3). Oligostilbenoid adalah senyawa turunan fenol yang tersusun oleh unit-unit resveratrol atau 3,5,4'-trihidroksistilben (3) melalui reaksi penggabungan kopling oksidatif. Sesuai dengan jumlah unit penyusunnya, oligostilben terbagi ke dalam kelompok dimer, trimer, tetramer, heksamer, heptamer, dan oktamer stilben. Senyawa-senyawa ini telah berhasil diisolasi dari 5 famili, yaitu Dipterocarpaceae, Vitaceae, Cyperaceae, Gnetaceae, dan Leguminosae. Review tentang senyawa oligostilbenoid pertama kali ditulis oleh (Sotheeswaran, 1993), kemudian oleh Takaya (2001) untuk oligostilben yang berasal dari famili Vitaceae, dan oleh (Hakim, 2002) khususnya untuk oligostilben dalam famili Dipterocarpaceae.

Ditinjau dari struktur kimianya, senyawa oligostilben dapat dibagi atas dua kelompok, yaitu kelompok yang mengandung paling sedikit satu cincin lima heterosiklik yang menjadi

Tabel 2.1. Senyawa oligoresveratrol pada genus *Vitis* dan distribusinya

No	Nama senyawa	kelompok	Sumber	Pustaka
	Resveratrol (3)	monomer	<i>V. vinifera</i>	Takaya, 2001
	Pterostilben (5)	monomer	<i>V. vinifera</i>	Takaya, 2001
	(+)- ϵ -Viniferin (6)	dimer	<i>V. vinifera</i> , <i>V. heyneana</i>	Takaya, 2001 Li, 1996
4	(+)- ϵ -Viniferin diol/betulifol B (7)	dimer	<i>V. betulifolia</i>	Li, 1998
5	Betulifol A (8)	dimer	<i>V. betulifolia</i>	Li, 1998
6	Ampelopsin A (9)	dimer	<i>V. heyneana</i>	Li, 1996
7	Amurensin C (10)	trimer	<i>V. amurensis</i>	Huang, 2000
8	Amurensin D (11)	trimer	<i>V. amurensis</i>	Huang, 2000
9	Ampelopsin C (12)	trimer	<i>V. heyneana</i>	Li, 1996
10	Vitisifuran A (13)	tetramer	<i>V. vinifera</i>	Ito, 1999
11	Vitisifuran B (14)	tetramer	<i>V. vinifera</i>	Ito, 1999
12	Heyneanol A (15)	tetramer	<i>V. heyneana</i>	Li, 1996
13	(+)-hopeafenol (16)	tetramer	<i>V. amurensis</i>	Huang, 2001
13	Amurensin E (17)	pentamer	<i>V. amurensis</i>	Huang, 2000
14	Amurensin F (18)	pentamer	<i>V. amurensis</i>	Huang, 2000

Disamping senyawa resveratrol dan turunannya, pada genus *Vitis* juga dilaporkan adanya senyawa golongan fenolik yang lain. Senyawa-senyawa tersebut adalah : (+)-katecin (19), (-)-epikatecin (20), asam galat (21), asam elagat (22), mirisetin (23), kuersetin (24) dan kaemferol (25) (Pastrana-Bonilla, 2003).



Gambar 2.3. Struktur beberapa senyawa golongan fenolik lain pada genus *Vitis*

2.6. Aktivitas Biologi Senyawa Turunan Resveratrol dan Oligoresveratrol

Senyawa resveratrol dan oligoresveratrol dilaporkan memiliki aktivitas antikanker, antioksidan, fitoaleksin, antifungal, hepatoprotektif, hepatotoksik, dan inhibitor pada biosintesis eukotriena (Yoshiaki, 2001). Beberapa contoh aktivitas masing-masing senyawa terlihat pada tabel 2.

Tabel 2.2. Aktivitas biologi beberapa senyawa turunan resveratrol dan oligoresveratrol

Aktivitas biologi	Nama senyawa	Pustaka
Antikanker	resveratrol	Yoshiaki, 2001 Jang, 1997 Clement, 1998
Antioksidan	Resveratrol Glikosida resveratrol	Yoshiaki, 2001 Goldberg, 1996
Fitoaleksin	Pterostilben Resveratrol (+)- ϵ -Viniferin α -Viniferin	Yoshiaki, 2001
Antifungal	Cyphostemmin A Cyphostemmin B	Yoshiaki, 2001

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian

3.1.1. Tujuan umum

Mengetahui potensi antioksidan dan antikanker buah anggur lokal (*Vitis labrusca*) sehingga dapat merekomendasikan pemanfaatan anggur lokal yang lebih luas selain sebagai buah segar, misalnya sebagai bahan makanan sehat (health food) atau obat-obatan alami.

3.1.2. Tujuan khusus

Tujuan khusus pada penelitian ini adalah:

- a. Mendapatkan ekstrak buah anggur lokal (*Vitis labrusca*).
- b. Melakukan isolasi senyawa fenolik dari ekstrak buah anggur lokal (*Vitis labrusca*).
- c. Mengetahui hasil uji aktivitas antioksidan dari ekstrak dan senyawa hasil isolasi buah anggur lokal (*Vitis labrusca*).
- d. Mengetahui hasil uji aktivitas antikanker dari ekstrak buah anggur lokal (*Vitis labrusca*).
- e. Membandingkan aktivitas antioksidan dari beberapa macam ekstrak buah anggur lokal (*Vitis labrusca*).
- f. Membandingkan aktivitas antikanker dari beberapa macam ekstrak buah anggur lokal (*Vitis labrusca*).

- g. Membandingkan aktivitas antioksidan dari beberapa macam isolat murni pada buah anggur lokal (*Vitis labrusca*).

3.1. Manfaat Penelitian

Penelitian ini adalah langkah awal dari suatu rangkaian kegiatan evaluasi sumber daya potensi daerah di wilayah Jawa Timur, yaitu tanaman anggur lokal Probolinggo yang merupakan tanaman unggulan Kabupaten Probolinggo, Jawa Timur, sebagai sumber bahan kimia yang berguna dalam bioindustri. Sejak awal peradaban umat manusia, tumbuh-tumbuhan telah menyediakan berbagai bahan primer untuk memenuhi kebutuhan hidup bagi kesejahteraan umat manusia, seperti pangan, sandang, papan, energi, dan bahan-bahan kimia untuk obat-obatan, agroindustri, dan bahan baku industri lainnya. Walaupun demikian, sebagian besar (lebih 99%) dari tumbuh-tumbuhan belum pernah diselidiki secara kimia, apalagi tumbuh-tumbuhan yang berada di daerah tropika.

Dengan akan ditemukannya senyawa-senyawa bioaktif pada tanaman anggur lokal Probolinggo serta aktivitas antioksidan dan antikankernya akan memberikan banyak informasi dan peluang baru bagi pemanfaatan anggur lokal yang sebelumnya hanya sebagai sumber penghasil buah segar, misalnya diolah sebagai bahan produk makanan sehat (health food) atau obat-obatan alami. Dengan demikian akan menarik investor untuk mengembangkan anggur ini di wilayah Probolinggo lebih besar lagi dan mungkin juga di daerah lain di wilayah di Indonesia yang sesuai. Disamping itu senyawa bioaktif yang telah berhasil diisolasi, dapat diproduksi dalam jumlah besar dengan cara sintesis maupun dengan menggunakan metode kultur jaringan untuk memperbanyak jumlah biomassa. Untuk meningkatkan aktivitas senyawa hasil isolasi,

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Alur Penelitian

Proses penelitian yang dilakukan mengikuti langkah-langkah sebagai berikut :

- a. Pengumpulan bahan, bahan berupa buah anggur lokal (*Vitis labrusca*) dibeli dari pasar Sepanjang, Kecamatan Taman, Kabupaten Sidoarjo, Jawa Timur, Indonesia.
- b. Pemisahan antara buah anggur dengan tangkai buah dan pemisahan buah anggur yang kurang baik.
- c. Penghalusan buah anggur segar serta pemisahan antara cairan dan ampasnya.
- d. Pembuatan ekstrak methanol, n-heksan, kloroform dan etil asetat dan metanol-air sisa dari cairan buah anggur dan juga ampasnya.
- e. Analisis kromatografi lapis tipis untuk menetapkan strategi pemisahan dan pemurnian senyawa bioaktif turunan resveratrol dan oligoresveratrol yang terdapat pada masing-masing ekstrak.
- f. Isolasi senyawa bioaktif dengan berbagai teknik kromatografi.
- g. Verifikasi kemurnian senyawa hasil isolasi.
- h. Analisis spektroskopi terhadap isolat murni.
- i. Analisis spektrum dan penentuan struktur molekul.
- j. Uji aktivitas antioksidan dari ekstrak n-heksan, kloroform, etil asetat, dan metanol-air sisa dari cairan buah anggur dan juga ampasnya.

k. Uji aktivitas antikanker dari ekstrak n-heksan, kloroform, etil asetat, dan metanol-air sisa dari cairan buah anggur.

1. Analisis aktivitas antioksidan dan antikanker dari masing-masing ekstrak dan isolat murni.

2. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di tiga tempat:

1. Isolasi, penentuan struktur, dan uji aktivitas antioksidan dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Airlangga, Surabaya.

2. Uji aktivitas antikanker dilaksanakan di Laboratorium Botanifarmasi-Farmakognosi, Bagian Ilmu Bahan Alam, Fakultas Farmasi UNAIR

3. Pemurnian dan analisis dengan HPLC serta HPLC preparatif, dan analisis dengan spektroskopi $^1\text{H-NMR}$ serta $^{13}\text{C-NMR}$ dilaksanakan di dilaksanakan di faculty of Pharmacy, Meijo University, Nagoya, Japan.

4.3 Bahan dan Alat Penelitian

4.3.1 Bahan penelitian

Bahan penelitian yang digunakan berupa buah anggur lokal (*Vitis labrusca*) yang dibeli di pasar Sepanjang, Kecamatan Taman, Kabupaten Sidoarjo, Jawa Timur, Indonesia setelah memperhatikan ciri-ciri yang diungkapkan dalam literatur dan mengkonsultasikannya dengan pakar dari kebun percobaan anggur di desa Banjarsari, kecamatan Probolinggo.

4.3.2 Bahan kimia

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah metanol, aseton, n-heksana, kloroform, etil asetat, akuades, pelat silika gel GF₂₅₄, silika gel GF₆₀, silika gel GF₂₅₄,

alam corong pisah dan dikocok beberapa saat untuk memastikan adanya kontak antara sampel dengan n-heksan. Setelah pengocokan dianggap cukup, campuran diiamkan di dalam corong pisah sampai terbentuk dua lapisan yang sempurna. Lapisan atas adalah lapisan sampel yang larut dalam n-heksan dan lapisan bawah adalah lapisan sampel yang tidak larut dalam n-heksan. Kedua lapisan ini dipisahkan dan proses ini dilaksanakan selama tiga kali. Lapisan n-heksan dari tiga kali proses selanjutnya digabung dan diuapkan dengan rotary vacuum evaporator sampai semua n-heksan menguap. Ekstrak yang diperoleh ini selanjutnya disebut ekstrak n-heksan dari cairan (ekstrak H-Cairan).

Terhadap cairan yang mengandung sampel tidak larut dalam n-heksan, dengan cara yang sama selanjutnya diekstraksi cair-cair dengan menggunakan pelarut berturut-turut kloroform dan etil asetat. Sehingga pada akhir proses ekstraksi diperoleh ekstrak n-heksan dari cairan (Hex-cairan), ekstrak kloroform dari cairan (CHCl_3 -cairan), ekstrak etil asetat dari cairan (EA-cairan), dan ekstrak metanol-air sisa cairan ($\text{MeOH-H}_2\text{O}$ -cairan). Masing-masing ekstrak selanjutnya ditimbang untuk mengetahui rendemennya.

Terhadap ampas buah anggur yang telah dikeringkan, selanjutnya ditimbang dan diekstraksi dalam labu erlenmeyer dengan menggunakan pelarut metanol. Proses ekstraksi dipercepat dengan meletakkan labu erlenmeyer diatas sonikator selama 2 jam. Selanjutnya dipisahkan antara ekstrak dan supernatan. Ekstraksi dengan cara yang sama diulang sebanyak 3 kali. Supernatan yang diperoleh dari 3 kali proses ekstaksi, digabung dan diuapkan dengan rotary vacuum evaporator sampai semua metanol menguap. Ekstrak kental yang diperoleh ditimbang untuk mengetahui rendemennya.

Ekstrak metanol yang diperoleh ini, selanjutnya dilarutkan kembali dengan metanol-air (perbandingan 1:1) dan diekstraksi cair-cair dengan menggunakan pelarut berturut-turut n-heksan, kloroform, serta etil asetat, sehingga diperoleh ekstrak n-heksan (Hex-ampas), kloroform (CHCl₃-ampas), etil asetat (EA-ampas), dan metanol-air sisa (MeOH-H₂O-ampas) dari ampas. Masing-masing ekstrak diuapkan dengan rotary vacuum evaporator sampai semua pelarut menguap dan ditimbang untuk mendapatkan rendemennya.

4.4.2. Hidrolisis ekstrak MeOH-H₂O-cairan

Sebanyak 30 g ekstrak metanol air sisa dilarutkan ke dalam 200 mL metanol, kemudian ditambahkan 20 mL HCl 6 N dan 50 mL H₂O. Selanjutnya dihomogenkan dengan menggunakan sonikator selama 2 menit. Larutan yang terbentuk dipanaskan pada suhu 60°C selama 3 jam. Setelah itu dihomogenkan lagi dalam sonikator selama 2 menit.

Untuk mendapatkan senyawa hasil hidrolisis, dilakukan dengan cara ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut kloroform sebanyak 3 kali. Ekstrak kloroform yang diperoleh diuapkan dengan rotary vacuum evaporator dan dipisahkan dengan teknik kromatografi untuk mendapatkan isolat murni.

4.4.3. Uji kromatografi lapis tipis (KLT) dan HPLC masing-masing ekstrak dan isolat murni

Terhadap masing-masing ekstrak dan isolat murni yang diperoleh dilakukan uji KLT dan HPLC dengan menggunakan eluen yang sesuai. Uji KLT dilakukan dengan cara melarutkan sedikit sampel kedalam pelarut yang sesuai dan menotolkan larutan tersebut ke dalam plat tipis silika gel (TLC aluminium sheets, silica gel 60 F₂₅₄). Setelah pelarut menguap, plat dielusi dalam bejana kromatografi yang telah dijenuhkan dan ditunggu proses elusi sampai dengan garis batas. Jika proses elusi telah selesai, selanjutnya plat KLT diperiksa dengan menggunakan lampu

UV untuk mengetahui adanya komponen/spot yang berpendar dibawah sinar UV. Setelah komponen yang berpendar di bawah lampu UV ditandai dengan pensil, plat KLT disemprot dengan penampak noda anisaldehyd.

Untuk uji dengan HPLC dilakukan dengan cara melarutkan 0,5 mg sampel kedalam 1 mL pelarut yang sesuai. Untuk memastikan bahwa dalam kolom HPLC tidak tertinggal senyawa lain yang diuji sebelumnya, kolom HPLC terlebih dulu dicuci dengan metanol selama \pm 30-60 menit. Kemudian pencucian dilanjutkan dengan eluen yang akan digunakan selama \pm 10 menit dan diikuti dengan proses baseline correction selama \pm 10 menit. Setelah proses baseline correction menunjukkan bahwa kolom bersih, selanjutnya diambil sampel sebanyak 10 μ L dan diinjeksikan ke dalam kolom dan proses analisis dilangsungkan, proses analisis dan komposisi eluen yang digunakan tergantung pada sampel yang dianalisis.

4.4.4. Pemisahan dan pemurnian senyawa dari ekstrak kloroform cairan dan ekstrak etil asetat cairan dengan HPLC preparatif

Untuk mendapatkan senyawa murni, dapat dilakukan dengan menggunakan HPLC preparatif. Eluen yang digunakan didasarkan pada analisis yang telah dilakukan sebelumnya pada uji HPLC. Sebanyak 100 mg sampel dilarutkan dalam 5 mL pelarut yang sesuai. Selanjutnya diinjeksikan ke dalam kolom HPLC yang telah dicuci dengan metanol sebelumnya. Jumlah sampel yang diinjeksikan tergantung dengan pola pemisahan yang terjadi dengan melihat pola kromatogram yang terbentuk. Untuk HPLC preparatif yang ada di lab Natural product resources, Faculty of Pharmacy, Nagoya University, maksimum sampel yang dapat dimasukkan untuk sekali running adalah 1000 μ L.

Nomor tabung	Asam askorbat (μL)	H_2O (μL)
I	20	1980
II	100	1900
III	200	1800
IV	1000	1000
V	2000	0

B. Pembuatan buffer asetat pH 5,5

Sebanyak 50 mL 0,2 M CH_3COONa kemudian tambahkan sedikit demi sedikit CH_3COOH dan dicek pH nya menggunakan pH-meter sampai diperoleh harga pH 5,5. pH-meter yang digunakan terlebih dahulu dikalibrasi.

C. Pembuatan larutan 5×10^{-4} DPPH dalam etanol

Untuk membuat 10 mL larutan 5×10^{-4} DPPH dalam etanol adalah dengan melarutkan $1,97 \times 10^{-3}$ g DPPH dalam 9,99803 mL etanol.

D. Uji aktivitas asam askorbat (vitamin C) sebagai pembanding

Masing-masing isi tabung reaksi asam askorbat yang telah dibuat menurut prosedur A. (tabung I, II, III, IV, dan V) dipindahkan kedalam 3 buah tabung reaksi dengan jumlah volume sebanyak 500 μL . Sehingga akan didapat tabel sbb:

Nomor tabung	Nomor tabung	Nomor tabung	Nomor tabung	Nomor tabung
I	IA	IB	IC	Isisa
II	IIA	IIB	IIC	IIsisa
III	IIIA	IIIB	IIIC	IIIsisa
IV	IVA	IVB	IVC	IVsisa
V	VA	VB	VC	Vsisa

Catatan: masing2 tabung berisi 500 μ L dan tabung I, II, III, IV, & V menjadi kosong

Selanjutnya kedalam masing2 tabung reaksi (A sampai C) ditambahkan buffer asetat 0,2M sebanyak 500 μ L dan 1000 μ L etanol sehingga volume menjadi 2000 μ L. Ke dalam campuran ini dimasukkan 500 μ L 5×10^{-4} DPPH. Campuran dikocok menggunakan vortex dalam ruang gelap (kedap cahaya UV) dan ditunggu sampai dengan 30 menit kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV pada λ 517 nm. Untuk menjaga agar sampel tidak terganggu oleh cahaya, pada saat akan di bawa ke ruang spektrofotometer UV tabung reaksi dibungkus dengan alumunium foil.

Supaya pengukuran berjalan dengan baik, diberi jeda waktu penambahan DPPH \pm 10 menit, misalnya seperti terlihat dalam tabel berikut (dapat disesuaikan dengan keadaan):

No tabung	Waktu penambahan DPPH	Waktu pengukuran	catatan
IA,IB,IC	02.00	02.30	Bila sudah 30 menit dimasukkan ke dalam cuvet dan ukur serapannya pada $\lambda 517$ nm
IIA,IIB,IIC	02.10	02.40	
IIIA,IIB,IIC	02.20	02.50	
dst	03.00	03.30	

E. Pembuatan larutan blanko

Disiapkan 3 buah tabung reaksi masing-masing diisi dengan 500 μ L H₂O + 500 μ L buffer asetat + 1000 μ L etanol + 500 μ L DPPH dan setelah 30 menit diukur serapannya. Pengujian blanko ini juga dikerjakan di dalam ruang gelap. Untuk menjaga agar sampel tidak terganggu oleh cahaya, pada saat akan di bawa ke ruang spektrofotometer UV tabung reaksi dibungkus dengan aluminium foil.



Gambar 4.1. Tabung reaksi dibungkus dengan aluminium foil, untuk menghindari adanya pengaruh sinar UV terhadap DPPH

F. Uji aktivitas sampel (ekstrak dan isolat)

Ditimbang 2,5 mg sampel dan dilarutkan kedalam 5 mL etanol. Kemudian larutan ini dibagi ke dalam lima tabung reaksi dan masing-masing tabung reaksi diencerkan dengan air dengan komposisi sebagai berikut:

Nomor tabung	Sampel (μL)	H ₂ O (μL)
S-1	20	3980
S-2	100	3900
S-3	200	3800
S-4	1000	3000
S-5	2000	2000

Masing-masing isi tabung reaksi berisis sampel yang telah dibuat pada table tersebut diatas (S-1 s/d S-5), selanjutnya dipindahkan kedalam 3 buah tabung reaksi dengan jumlah volume sebanyak 1000 μL . Sehingga akan didapat tabel sbb:

Nomor tabung	Nomor tabung	Nomor tabung	Nomor tabung	Nomor tabung
S-1	S-1A	S-1B	S-1C	Isisa
S-2	S-2A	S-2B	S-2C	IIsisa
S-3	S-3A	S-3B	S-3C	S-3sisa
S-4	S-4A	S-4B	S-4C	IVsisa
S-5	S-5A	S-5B	S-5C	Vsisa

Catatan: masing2 tabung berisi 500 μL dan tabung I, II, III, IV, & V menjadi kosong

Selanjutnya kedalam masing2 tabung reaksi (A sampai C) ditambahkan buffer asetat 0,2M sebanyak 1000 μ L. Ke dalam campuran ini dimasukkan 500 μ L 5×10^{-4} DPPH. Campuran dikocok menggunakan vortex dalam ruang gelap (kedap cahaya UV) dan ditunggu sampai dengan 30 menit kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV pada $\lambda 517$ nm. Untuk menjaga agar sampel tidak terganggu oleh cahaya, pada saat akan di bawa ke ruang spektrofotometer UV tabung reaksi dibungkus dengan alumunium foil.

Supaya pengukuran berjalan dengan baik, diberi jeda waktu penambahan DPPH \pm 10 menit, misalnya seperti terlihat dalam tabel berikut (dapat disesuaikan dengan keadaan):

No tabung	Waktu penambahan DPPH	Waktu pengukuran	catatan
S-1A,S-1B,S-1C	02.00	02.30	Bila sudah 30 menit dimasukkan ke dalam cuvet dan ukur serapannya pada $\lambda 517$ nm
S-2A,S-2B,S-2C	02.10	02.40	
S-3A,S-3B,S-3C	02.20	02.50	
dst	03.00	03.30	

4.4.8. Uji BSLT (Brine Shrimp Lethality test) terhadap ekstrak

A. Penyiapan larutan sampel (1000 ppm)

Sampel (ekstrak) ditimbang 1 mg, dilarutkan dalam 100 μ L (etanol, atau metanol, dan atau DMSO) sambil diaduk, ditambah 250 μ L aquades sambil diaduk, dan dicatat warna larutan. Selanjutnya ke dalam 200 μ L larutan ini diencerkan dengan 600 μ L aquades sambil diaduk hingga homogen, dan selanjutnya disebut larutan sampel dengan konsentrasi 1000 ppm.

B. Penyiapan larutan kontrol

Larutan kontrol dibuat sama dengan prosedur di atas tanpa menggunakan sampel.

C. Penyemaian benur udang

Bibit udang (\pm 1000 bibit) disemaikan dalam 100 mL larutan garam (3,8%) dalam aquades menggunakan bak semai selama 48 jam. Setelah itu, benur udang ini siap digunakan untuk uji toksisitas.

D. Prosedur uji metode Meyer

1. Disiapkan dua plat mikro standar (yang mempunyai sumur kecil, terdiri dari 12 baris dan 8 kolom) masing-masing untuk plat uji dan plat kontrol.
2. Ke dalam baris I dan II masing-masingnya tiga kolom dimasukkan @ 100 μ L larutan sampel pada plat uji dan 100 μ L larutan kontrol pada plat kontrol.

4.4.9. Uji antikanker terhadap ekstrak

Pembuatan larutan stok, sebanyak 1,0 mg sampel dilarutkan dalam Dimethyl sulphoxide (DMSO) (1 ml) sebelum ditambahkan medium untuk kultur sel, sehingga konsentrasi larutan stok 1 mg/ml.

Kultur sel kanker HeLa (sek kanker servik manusia) dikultur dalam medium RPMI 1640 yang ditambah dengan 10% FBS, 100 µg/ml streptomisin, 100 unit/ml penisilin dan mM glutamin. Sel diinkubasikan pada suhu 37°C dengan CO₂ sebanyak 5%.

Sebanyak 2×10^5 sel T47-D yang telah diberi sampel dengan konsentrasi 62,5; 125; 250; 500; dan 1000µg/ml didalam 96-well microtiter plates, dan masing-masing konsentrasi diulang dalam 10 sumuran . Setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam kemudian viabilitas sel dianalisis dengan metode pewarnaan MTT. Dilakukan dengan penambahan 4 µl MTT (5mg/ml FBS) kedalam masing-masing sumuran dan diinkubasi selama 2 jam, dan kemudian disentrifuse dengan kecepatan 1800 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Larutan MTT diambil dari sumuran , kemudian kristal formasan dilarutkan dalam 150 µl DMSO. Absorbansi dianalisis dengan microplate reader pada panjang gelombang 540 nm. Aktivitas antikanker dihitung berdasarkan prosentase viabilitas sel = $(\text{Absorbansi Kontrol} - \text{Absorbansi Perlakuan} / \text{Absorbansi Kontrol} \times 100 \%)$. Dan dilanjutkan dengan penentuan harga IC₅₀ dengan menggunakan program persen robot. (Ahmad *et al* , 2001)

BAB V**HASIL DAN PEMBAHASAN****5.1. Penyiapan Sampel**

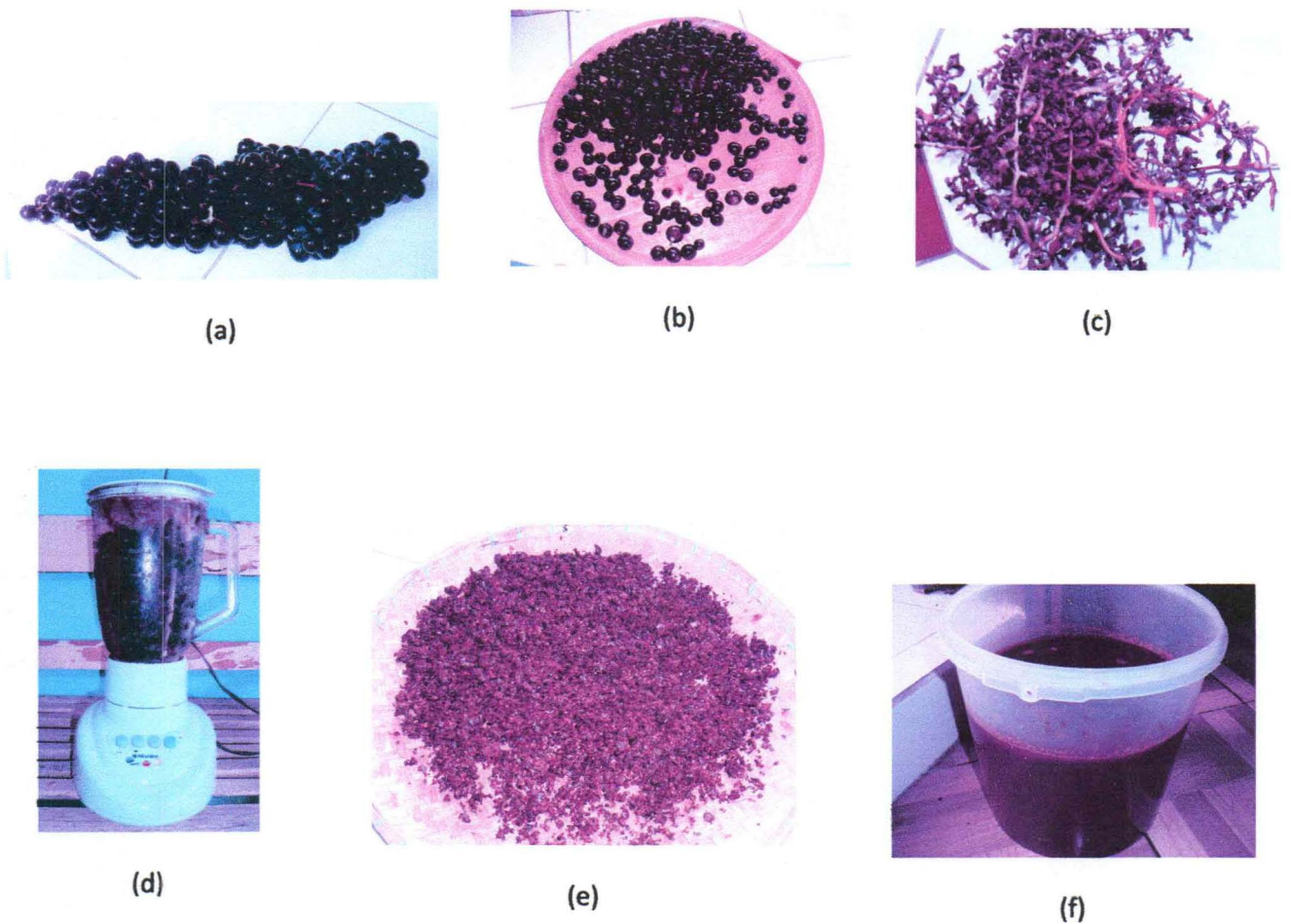
Buah anggur lokal segar dibeli dari pasar sepanjang, kecamatan Sepanjang, kabupaten Sidoarjo, Jawa Timur, Indonesia sebanyak 15 kg. Setelah dipisahkan dari tangkainya dan disortir buah yang tidak bagus kualitasnya, kemudian dicuci bersih dan ditiriskan, diperoleh buah segar terseleksi sebanyak 10 kg. Buah terseleksi ini selanjutnya dihaluskan dengan blender dan disaring untuk memisahkan cairan dan ampasnya. Cairan yang diperoleh siap untuk diekstraksi dan ampasnya dikeringkan dibawah sinar matahari untuk mengurangi kadar air dan menghindari tumbuhnya jamur. Untuk menghindari proses fermentasi, cairan yang telah dipisahkan dari ampasnya harus segera diekstraksi. Gambar 5.1. & 5.2 Memperlihatkan buah anggur segar di pasar Sepanjang, Taman, Sidoarjo dan hasil dari rangkain proses pemisahan cairan dan ampas anggur segar.



Gambar 5.1. Buah anggur segar di pasar Sepanjang, Taman, Sidoarjo

2. Pembuatan ekstrak buah anggur

Pembuatan ekstrak anggur dilakukan dengan dua cara, yaitu: ekstraksi terhadap cairan buah anggur segar dan ampas anggur yang telah dikeringkan terlebih dahulu. Hal ini dilakukan dengan pertimbangan bahwa pada umumnya anggur local dikonsumsi secara langsung buahnya dan beberapa orang membuang kulit dan bijinya apabila makan buah anggur local. Sedangkan



Gambar 5.2. (a) buah anggur segar yang diperoleh langsung dari pasar, (b) Buah anggur terseleksi, (c) tangkai buah anggur (d) buah anggur dalam proses penghalusan dengan blender (e) ampas buah anggur (f) cairan buah anggur segar yang telah dipisahkan dari ampasnya

berdasarkan studi literatur diketahui bahwa kandungan bahan antioksidan dan antikanker dari buah anggur yang telah diteliti, terutama justru terletak pada kulit buah atau wine. Oleh karena itu perlu juga dilakukan uji aktivitas pada masing-masing bagian tersebut.

Untuk mendapatkan ekstrak n-heksan, kloroform, etil asetat, dan methanol-air sisa dari cairan buah anggur segar, dilakukan dengan cara menyaring buah anggur yang telah dihancurkan dengan blender. Selanjutnya cairan yang diperoleh dicampur dengan methanol dengan perbandingan 1:1 dan diekstraksi cair-cair berturut-turut dengan n-heksan, kloroform, dan etil asetat. Masing-masing proses ekstraksi cair-cair dilakukan sebanyak tiga kali. Sedangkan ampas hasil penyaringan dikeringkan dibawah sinar matahari untuk selanjutnya akan juga diekstraksi.

Sebanyak 10 kg buah anggur segar, melalui proses ekstraksi cair-cair ini menghasilkan ekstrak n-heksan, kloroform, etil asetat, dan methanol sisa berturut-turut : 3 g (0,03%), 18 g (0,18%), 31 g (0,31%), dan 250 g (2,5%). Disamping itu juga diperoleh ampas kering sebanyak 200 g (2%).

Terhadap ampas buah anggur yang telah dikeringkan tersebut, selanjutnya dihaluskan dengan blender sekali lagi sehingga menjadi serbuk dan diekstraksi dengan methanol. Untuk mempercepat proses ekstraksi, dibantu dengan menggunakan sonikator. Sebanyak 100 g serbuk ampas buah anggur yang telah diekstraksi, dihasilkan ekstrak metanol = 8 g (8%), n-heksan = 100 mg (0,1%), kloroform = 2,5 g (2,5%), etil asetat = 3 g (3%), dan methanol-air sisa = 2 g (2%).

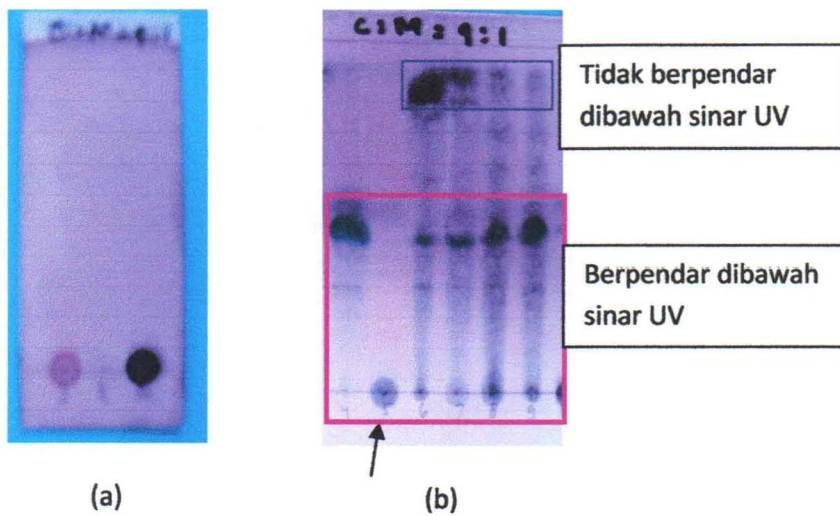
5.3. Hidrolisis Ekstrak MeOH-H₂O-cairan

Hidrolisis ekstrak MeOH-H₂O-cairan ini dilakukan setelah dilakukan uji KLT terhadap fraksi kloroform, etil asetat, dan metanol sisa dengan silika gel dan ODS tidak memperlihatkan

asil yang memuaskan, hal ini terlihat pada uji KLT, ekstrak yang diperoleh tidak mau bergerak dari garis dasar. Sehingga tidak dapat dijadikan indikator untuk melakukan proses pemisahan untuk mendapatkan isolat murni. Hal ini diduga senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak yang diperoleh dari cairan dalam bentuk glikosidanya sehingga terlalu polar. Terbukti setelah dilakukan proses pemisahan dari ekstrak kloroform dan etil asetat dari cairan, diperoleh senyawa glikosida (sub bab 5.5).

Sebanyak 30 g ekstrak metanol air sisa dilarutkan ke dalam 200 mL metanol, kemudian ditambahkan 20 mL HCl 6 N dan 50 mL H₂O. Selanjutnya dihomogenkan dengan menggunakan sonikator selama 2 menit. Larutan yang terbentuk dipanaskan pada suhu 60°C selama 3 jam. Setelah itu dihomogenkan lagi dalam sonikator selama 2 menit.

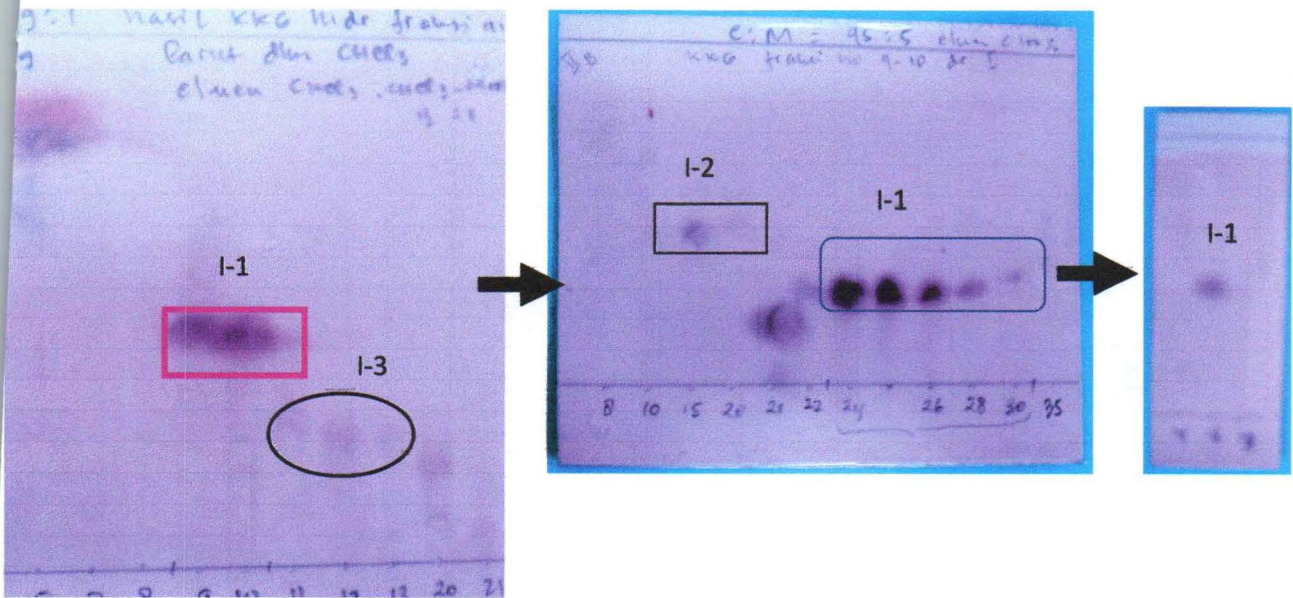
Senyawa hasil hidrolisis selanjutnya diekstraksi dengan kloroform menggunakan corong pisah sebanyak tiga kali. Selanjutnya ekstrak kloroform hasil hidrolisis diuapkan dengan rotary vacuum evaporator dan didapatkan padatan berwarna coklat muda sebanyak 1 g. Setelah dilakukan uji dengan KLT, terlihat bahwa senyawa hasil hidrolisis memperlihatkan pemisahan yang cukup signifikan, sehingga memungkinkan untuk dilakukan proses pemisahan dan pemurnian untuk mendapatkan isolat murni. Berdasarkan data uji TLC terlihat adanya komponen utama pada campuran senyawa hasil hidrolisis dan komponen utama ini berpendar dengan warna ungu dibawah sinar lampu UV, senyawa ini selanjutnya dijadikan target utama untuk diperoleh isolat murninya. Sedangkan spot yang cukup besar (warna hijau) dibagian atas kromatogram tidak berpendar di bawah sinar UV (Gamabar 5.3).



Gambar 5.3. Kromatogram TLC (a) sebelum hidrolisis (b) setelah hidrolisis, tanda panah ekstrak sebelum hidrolisis

5.4. Isolasi Senyawa Hasil Hidrolisis

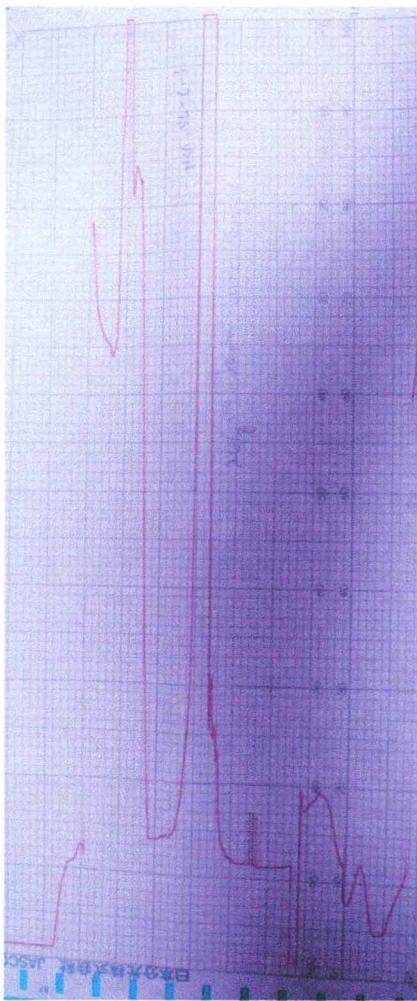
Sebanyak 1 gram campuran senyawa hasil hidrolisis dipisahkan dengan kolom kromatografi gravitasi menggunakan eluen campuran kloroform-metanol (9:1) diperoleh 21 fraksi. Fraksi no 10-11 yang mengandung noda utama, sebanyak 250 mg selanjutnya dipisahkan lebih lanjut dengan kromatografi kolom gravitasi menggunakan eluen kloroform 100% diperoleh dua buah isolat murni yaitu isolat 1 (yang merupakan spot utama) sebanyak 30 mg dan isolat 2 (minor) sebanyak 5 mg. Selanjutnya terhadap fraksi 11-13 juga digabung dan dipisahkan lebih lanjut dengan kromatografi kolom gravitasi menggunakan eluen campuran kloroform metanol (9:1) menghasilkan senyawa isolat 3 sebanyak 10 mg. Hanya saja kromatogram yang diperoleh tidak bagus setelah disemprot dengan anisaldehyd, sehingga tidak dapat disajikan dalam laporan ini.



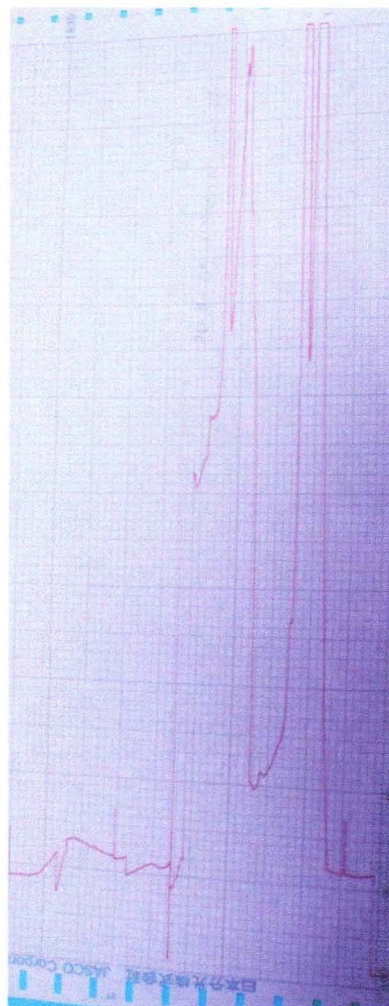
Gambar 5.4. Kromatogram proses pemisahan dan pemurnian untuk mendapatkan isolat murni

5.4. Isolasi Senyawa dari Ekstrak Kloroform dan Etil Asetat Cairan Anggur Segar

Pemisahan dan pemurnian terhadap ekstrak kloroform cairan anggur dengan HPLC preparatif menggunakan kolom develosil ODS UG-5 eluen dan eluen campuran methanol air (8:2) menghasilkan senyawa isolat 4 (gambar 5.5.(a)). Sedangkan dari ekstrak etil asetat dengan cara yang sama menghasilkan isolat 5 (gambar 5.5.(b)).



(a)



(b)

Gambar 5.5. Kromatogram pemisahan/pemurnian isolat 4 dari ekstrak kloroform (a) dan isolat 5 dari ekstrak etil asetat cairan buah anggur (b)

5.5. Analisis Senyawa Hasil Isolasi/ Isolat murni

Berdasarkan data spektrum $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ diketahui bahwa isolate 1 adalah suatu senyawa aromatik yang memiliki gugus karbonil. Analisis data $^1\text{H-NMR}$ terhadap isolat 2 menunjukkan bahwa isolat ini adalah suatu senyawa aromatik. Data $^1\text{H-NMR}$ isolat 3 dan

engan membandingkan dari literature diketahui bahwa isolate 3 adalah senyawa resveratrol (3).
bedangkan isolat 4 dan 5 adalah glikosida.

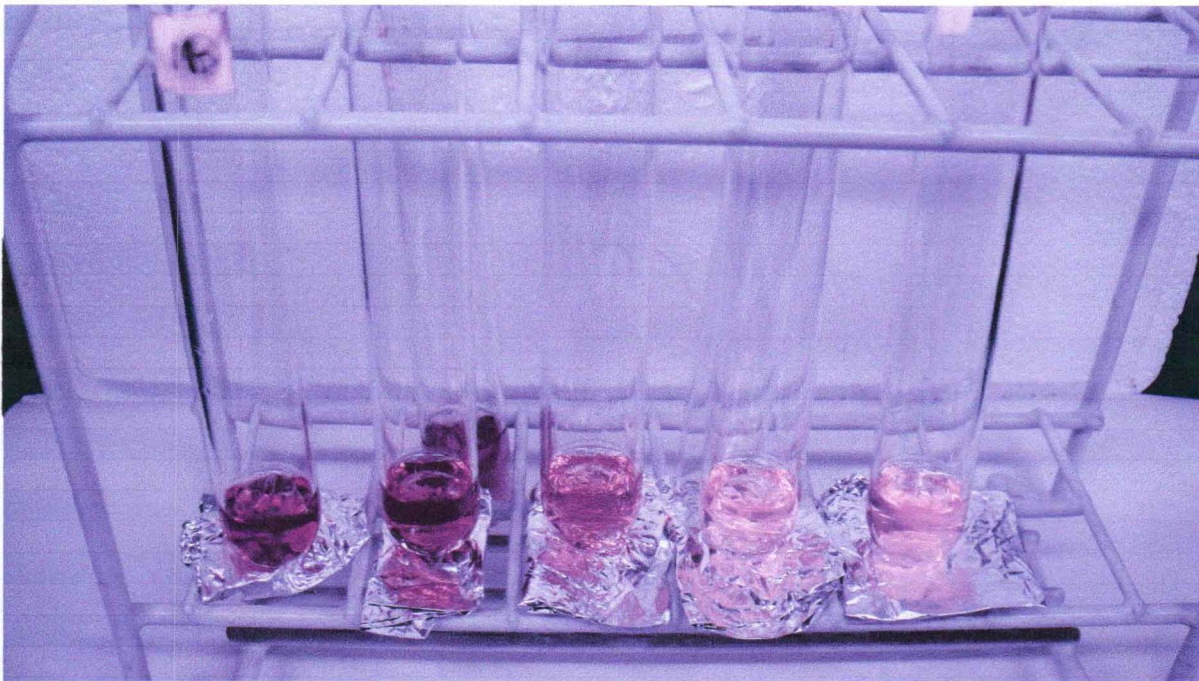
5.6. Uji aktivitas antioksidan ekstrak dan isolat murni

Metode yang digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan ekstrak dan isolat murni dari buah anggur lokal adalah dengan mengukur aktivitas penangkapan radikal bebas dari DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (1). DPPH merupakan radikal bebas yang stabil dengan delokalisasi elektron yang berlebih. Delokalisasi ini meningkatkan warna violet dan absorbansi dalam etanol sekitar 517 nm. Ketika DPPH bersama dengan senyawa lain yang siap memberikan atom hidrogen, maka akan terbentuk DPPH non radikal (2,2-difenil-1-pikrilhidrazin) (2), ditandai dengan hilangnya warna violet menjadi kuning pucat dari pikril yang masih ada (Molyneux, 2004).



Gambar 5.6. Perubahan warna DPPH dari violet menjadi warna kuning oleh senyawa

Uji aktivitas antioksidan dilakukan terhadap ekstrak n-heksan, kloroform, campuran kloroform-etil asetat, etil asetat, dan methanol air sisa dari cairan buah anggur lokal segar. Disamping itu juga dilakukan uji aktivitas terhadap ekstrak kloroform, etil asetat, dan methanol sisa dari ampas buah anggur. Terhadap empat isolat murni juga dilakukan uji aktivitas antioksidannya. Isolat 2 tidak dilakukan uji aktivitas karena jumlahnya sangat terbatas (5 mg). Data hasil uji aktivitas antioksidan seluruh ekstrak dan isolate murni dari buah anggur lokal terdapat dalam tabel 5.1. dan gambar 5.8 , 5.9., dan 5.10.



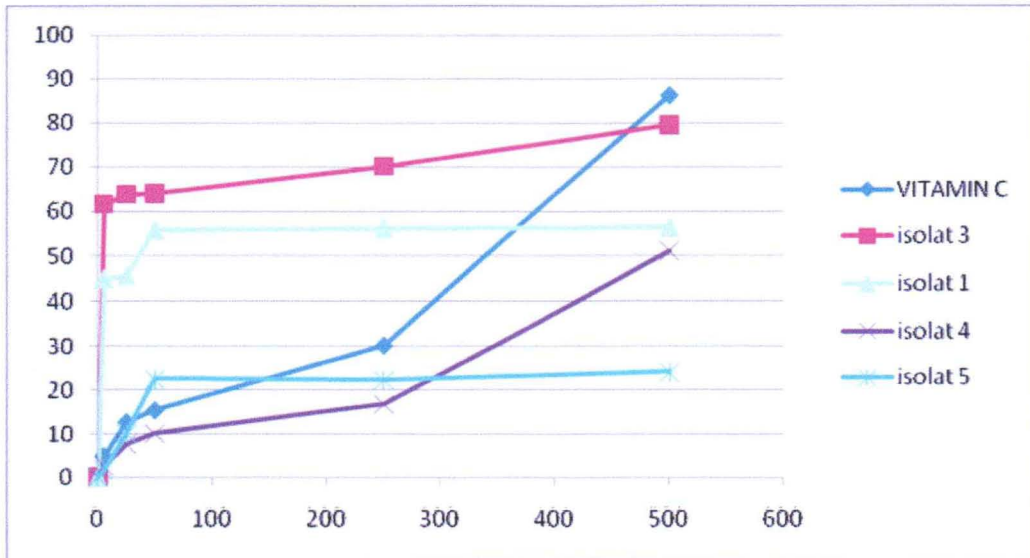
Gambar 5.7. Perubahan warna DPPH yang terjadi pada uji aktivitas antioksidan dengan perubahan konsentrasi pada larutan uji.

Berdasarkan data hasil uji antioksidan terhadap seluruh ekstrak dan isolat murni buah anggur lokal diketahui bahwa isolat 1, isolat 3, ekstrak kloroform dan methanol sisa dari ampas anggur, serta campuran senyawa hasil hidrolisis ekstrak methanol air cairan buah anggur memberikan

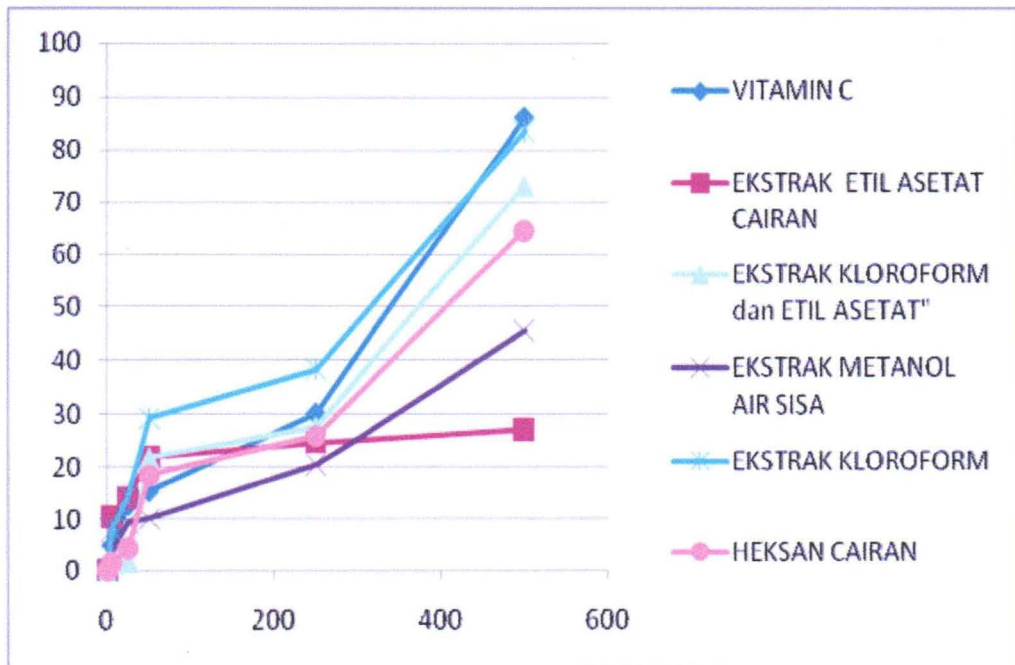
ilai IC_{50} yang lebih kuat dibanding vitamin C yang digunakan sebagai kontrol positif. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa buah anggur lokal sangat potensial untuk dijadikan sebagai bahan antioksidan.

Tabel 5.1. Data hasil Uji aktivitas antioksidan dari seluruh ekstrak dan isolat murni dari buah anggur lokal

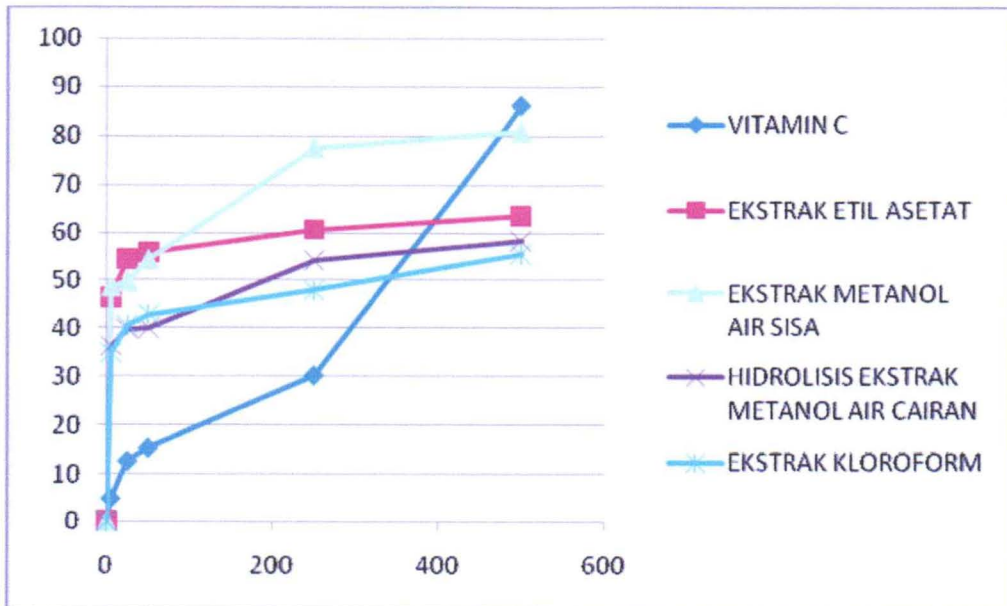
No	Nama ekstrak/isolat murni	Daya hambat terhadap DPPH 50% (IC_{50}) dalam mg/mL	Asal
1	Vitamin C	99,0	Merck (sebagai kontrol positif)
2	Isolat 1	72,9	Hasil hidrolisis ekstrak MeOH air sisa dari Cairan buah anggur
3	Isolat 2	Tidak diuji	
5	Isolat 3 (resveratrol)	< 5	
6	Isolat 4	487,8	Ekstrak kloroform cairan buah anggur
7	Isolat 5	>500	Ekstrak etil asetat cairan buah anggur
8	Ekstrak kloroform	329	Ampas buah anggur
9	Ekstrak etil asetat	16,3	
10	Ekstrak metanol air sisa	37,9	
11	Hasil hidrolisis ekstrak metanol air sisa	72,9	Cairan buah anggur
12	Ekstrak n-heksan	398,2	
13	Ekstrak kloroform	277,4	
14	Ekstrak etil asetat	>500	
15	Ekstrak □ metanol air sisa	>500	
16	Campuran ekstrak kloroform dan etil asetat	352	



Gambar 5.8. Grafik aktivitas antioksidan isolat murni dari cairan buah anggur lokal



Gambar 5.9. Grafik aktivitas antioksidan ekstrak-ekstrak dari cairan buah anggur lokal



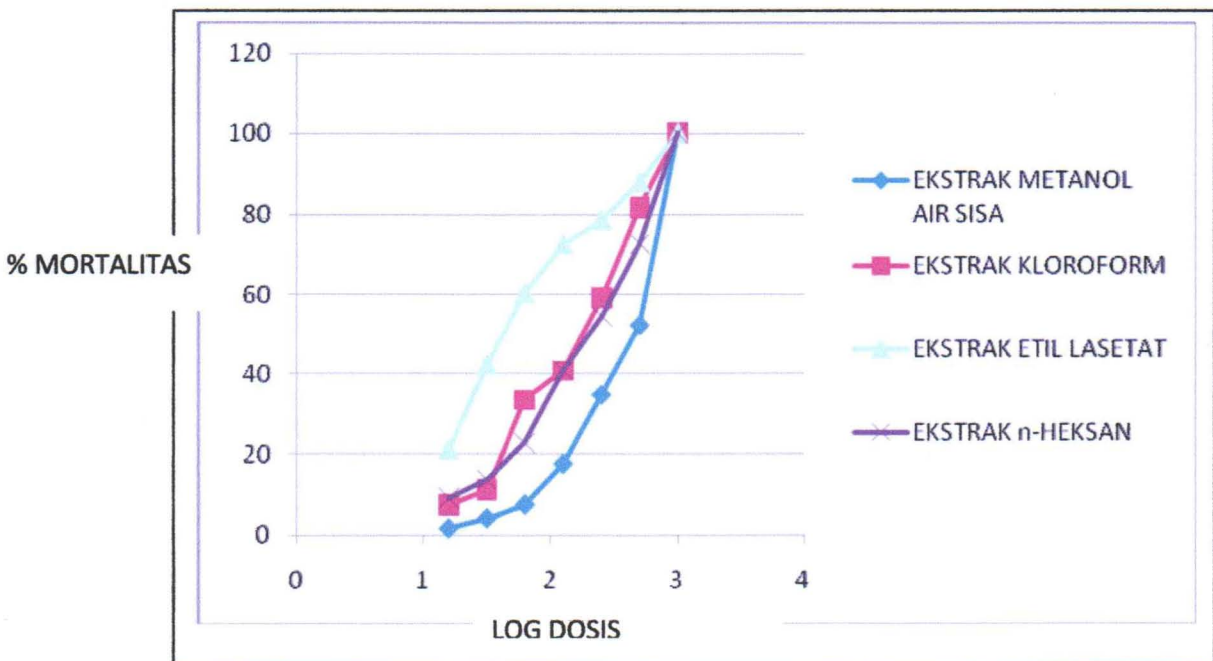
Gambar 5.10. Grafik aktivitas antioksidan ekstrak-ekstrak dari ampas buah anggur lokal

5.7. Uji Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) ekstrak cairan anggur

Uji BSLT dilakan menggunakan benur udang *Artemia salina*, uji ini pada beberapa literatur digunakan sebagai skrining awal untuk mendapatkan ekstrak atau isolate murni antikanker. Berdasarkan data hasil uji diketahui bahwa seluruh ekstrak cairan buah anggur menunjukkan toksisitas terhadap benur udang *Artemia salina* ($LC_{50} < 1000$ ppm).

Tabel 5.2. Data hasil Uji BSLT terhadap ekstrak cairan anggur lokal

No	Nama ekstrak/isolat murni	Toksisitas terhadap benur udang <i>Artemia salina</i> (LC ₅₀) dalam ppm	Asal
12	Ekstrak n-heksan	249,03	Cairan buah anggur
13	Ekstrak kloroform	227,62	
14	Ekstrak etil asetat	72,34	
15	Ekstrak □metanol air sisa	433,34	
16	Campuran ekstrak kloroform dan etil asetat	276,35	



Gambar 5.11. Grafik aktivitas antioksidan ekstrak-ekstrak dari ampas buah anggur lokal

8. Uji Aktivitas Antikanker Menggunakan Kultur sel kanker HeLa (sek kanker servik manusia)

Menggunakan metode MTT dengan parameter kemampuan konversi substrat MTT menjadi formazan oleh enzim suksinat dehidrogenase, hasil uji aktivitas antikanker dari beberapa ekstrak anggur terhadap sel kanker HeLa yang diinkubasi selama 24 jam disajikan pada tabel 5.3. Ekstrak anggur lokal yang digunakan adalah ekstrak air, ekstrak kloroform, ekstrak heksan, ekstrak etil asetat dan campuran ekstrak campuran etil asetat dan kloroform.

Tabel 5.3. Hasil Uji Aktivitas Antikanker dari Beberapa Ekstrak Anggur Lokal terhadap Sel Kanker HeLa dengan waktu inkubasi 24 jam

Sampel	Konsentrasi (µg/ml)	Persen Kematian Sel	IC ₅₀ µg/ml	Sampel	Konsentrasi (µg/ml)	Persen Kematian Sel	IC ₅₀ µg/ml
Ekstrak Air	1000	3	-	Ekstrak etil asetat	1000	66,80	-
	500	0			500	12,90	
	250	-1			250	-15	
	125	-1			125	-8	
	62,5	1,64			62,5	-1,4	
	0	0			0	0	
Ekstrak CHCl ₃	1000	6,59	-	Ekstrak CHCl ₃ + EA	1000	44,93	1072
	500	0			500	17,75	
	250	2,9			250	14,54	
	125	3,21			125	10,37	
	62,5	5,40			62,5	7,77	
	0	0			0	0	
Ekstrak heksan	1000	67,90	759				
	500	30					
	250	17,40					
	125	10,55					
	62,5	5,63					
	0	0					

Berdasarkan hasil uji antikanker diperoleh hasil IC₅₀ untuk ekstrak heksan sebesar 759 µg/ml dan ekstrak campuran kloroform dan etil asetat 1072 µg/ml, sedangkan untuk ekstrak yang

ain tidak dapat ditentukan harga IC_{50} . Harga IC_{50} tersebut cukup besar sehingga ekstrak heksan dan campuran ekstrak klorofom dan etil asetat dapat dikatakan bahwa ekstrak tersebut kurang poten terhadap sel kanker HeLa. Menurut NCI (National Cancer Institute) suatu ekstrak dikatakan poten sebagai antikanker jika harga $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/ml}$. Namun demikian jika dibandingkan antara aktivitas antikanker ekstrak heksan dan campuran ekstrak klorofom dan etil asetat terhadap sel kanker HeLa, maka ekstrak heksan lebih kuat dibanding ekstrak campuran.

Salah satu pengaruh uji akvitas antikanker secara *in vitro* adalah waktu inkubasi, maka untuk melihat pengaruh waktu inkubasi terhadap peningkatan aktivitas antkanker maka dilakukan penambahan waktu inkubasi menjadi 48 jam, dan hasil uji antikanker dapat dilihat pada tabel 5.4.

Berbeda dengan hasil uji antikanker pada inkubasi 24 jam, ternyata pada uji antikanker dengan sel kanker HeLa dengan inkubasi 48 jam terlihat harga IC_{50} ekstrak air adalah 1487,47 $\mu\text{g/ml}$, IC_{50} ekstrak heksan adalah 417,30 $\mu\text{g/ml}$, IC_{50} ekstrak etil asetat adalah 537,31 $\mu\text{g/ml}$ dan IC_{50} campuran ekstrak kloroform - etil asetat adalah 473,72 $\mu\text{g/ml}$, sedangkan ekstrak kloroform tidak bisa ditentukan harga IC_{50} nya. Walaupun hampir semua ekstrak anggur lokal tidak menunjukkan potensi sebagai antikanker, namun dari hasil tersebut diatas ternyata ekstrak heksan dari anggur lokal memiliki aktivitas antikanker yang lebih kuat dibandingkan dengan ekstrak yang lain.

abel 5.4. Hasil Uji Aktivitas Antikanker dari Beberapa Ekstrak Anggur Lokal terhadap Sel Kanker HeLa dengan waktu inkubasi 48 jam

Sampel	Konsentrasi (µg/ml)	Persen Kematian Sel	IC ₅₀ µg/ml	Sampel	Konsentrasi (µg/ml)	Persen Kematian Sel	IC ₅₀ µg/ml
Ekstrak Air	1000	30,00	1487,47	Ekstrak etil asetat	1000	81,30	537,31
	500	17,40			500	74,90	
	250	14,00			250	10,80	
	125	12,20			125	8,80	
	62,5	11,30			62,5	8,80	
	0	0			0	0	
Ekstrak CHCl ₃	1000	23,0	-	Ekstrak CHCl ₃ + EA	1000	85,0	473,72
	500	20,67			500	82,30	
	250	18,45			250	14,00	
	125	-2			125	13,70	
	62,5	-3			62,5	12,10	
	0	0			0	0	
Ekstrak heksan	1000	85,80	417,30				
	500	86,20					
	250	40,2					
	125	16,9					
	62,5	7,1					
	0	0					

BAB VI

KESIMPULAN

1. Proses ekstraksi terhadap cairan buah anggur lokal segar menghasilkan ekstrak n-heksan, kloroform, etil asetat, dan methanol sisa berturut-turut : 3 g (0,03%), 18 g (0,18%), 31 g (0,31%), dan 250 g (2,5%). Sedangkan dari ampasnya diperoleh ekstrak metanol = 8 g (8%), n-heksan = 100 mg (0,1%), kloroform = 2,5 g (2,5%), etil asetat = 3 g (3%), dan methanol-air sisa = 2 g (2%).
2. Sebanyak lima buah senyawa fenolik isolat murni telah diperoleh dari proses isolasi dan pemurnian terhadap ekstrak kloroform, etil asetat, dan hasil hidrolisis dari ekstrak methanol air cairan buah anggur segar.
3. Ekstrak kloroform dan metanol sisa dari ampas anggur, serta campuran senyawa hasil hidrolisis ekstrak metanol air cairan buah anggur memberikan nilai IC_{50} yang lebih kuat dibanding vitamin C yang digunakan sebagai kontrol positif. Sedangkan ekstrak kloroform dari ampas serta ekstrak n-heksan, kloroform, dan campuran kloroform etil asetat memiliki aktivitas antioksidan yang lebih rendah dibanding vitamin C. Dua buah ekstrak yaitu ekstrak etil asetat dan methanol air sisa dari cairan buah anggur lokal tidak aktif ($IC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$).
4. Ekstrak etil asetat ampas anggur lokal mempunyai aktivitas antioksidan yang paling tinggi dibanding ekstrak yang lain.
5. Tiga buah senyawa isolat murni (isolat 1, $IC_{50} = 72,9 \mu\text{g/mL}$; isolat 3/resveratrol, $IC_{50} < 5 \mu\text{g/mL}$, dan isolat 4, $IC_{50} = 487,8 \mu\text{g/mL}$) dari empat isolat yang diuji.

DAFTAR PUSTAKA

1. Bokel, M., Diyasena, M.N.C., Gunatilaka, A.A.L., Kraus, W., Sotheeswaran S., 1988, Caliculatol, an antifungal resveratrol trimer from *Stemonoporus canaliculatus*, *Phytochemistry*, **27**, 377-380
2. Cos, P., et.al., 1998, Structure –Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxidase Scavengers, *J. Nat. Pro.*, **61**, 71-76.
3. Cuendet, M., Hostetmann, K., and Potteral, O., 1997, Flavonoids with Free Radical Scavenging From *Fagrae blumei*, *Helvetica Chimica Acta*, **80**, 1144-52.
4. Gonda, R., Takeda, T. and Akiyama, T., 2000, Studies on the *Anaxagorea luzonensis* A.Gray., *J. Chem. Pharm. Bull.*, **48(8)**, 1219-22
5. Dai, J.R., Y.F. Hallock, J.H. Cardellina II, M.R., Boyd (1998), HIV-Inhibitory and cytotoxic oligostilbenes from the leaves of *Hopea malibato*, *J. Nat. Prod.*, **61**, 351-353
6. Diyasena, M.N.C., Sotheeswaran, S., Surendrakumar, S., Balasubramaniam, S., Bokel, M., dan Kraus, W. (1985). Balanocarpol, a New Polyphenol from *Balanocarpus zeylanicus* (Trimen) and *Hopea jucunda* (Thw.) (Dipterocarpaceae), *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, **8**, 1807-1809.
7. Evan. G and Littlewood. T.D. 1998. A Matter of Life and Cell Death, *Science*. **281** : 1317-1322.
8. Fisher,D.E.,1994. Apoptosis in Cancer Therapy : crossing the threshold, *Cell* , **78**, 539-42.

9. Goldberg, DM (1996), More on antioxidant activity of resveratrol in red wine, *Clin Chem*, **42**, 113-114
10. Geewananda, Y.A., P. Gunawardena, S. Sotheeswaran, M.U.S. Sultanbawa, S. Surendrakumar, P. Bladon (1986), Another antibacterial polyphenol, coppaliferol B, from *Vateria copallifera* (Dipterocarpaceae), *Phytochemistry*, **25**, 1498-1500
11. Gibbs, J.B. 2000. Anticancer drug target : Growth Factor and Growth Factor Signaling, *J.Clin.Invest*, 105,9-13.
12. Hsiang, Y.H., et al. 1989. Arrest of Replication Fork by Drug-stabilized Topoisomerase I-DNA Cleavable Complexes as a Mechanism of Cell Killing by Camptothecin, *Cancer Research*, **49**, 5077-5082
13. Hakim, E.H. (2002a). "Oligostilbenoid dari Tumbuh-Tumbuhan Dipterocarpaceae", *Bull. Soc. Nat. Prod. Chem. (Indonesia)*, 2(1), 1.
14. Heyne, K., *Tumbuhan Berguna Indonesia* (1987), Badan Litbang Kehutanan Jakarta, Jilid III, p. 1390-1443.
15. Jang M, Cai L, Udeani GO, et al.(1998), Cancer chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, trigger CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells, *Blood* **92**, 996-1002
16. Jianguo, M., Karin, Reed, A., and James, M., Gallo, 2002, Cells Designed to Deliver Anticancer Drug by Apoptosis, *Cancer Research*, **62**, 1382-7.
17. Keshet, E., and Bens Sasson, S.A., 1999. Anticancer drug target : Approching angiogenesis, *J.Clin.Invest.*, 104(11), 1407-501.

18. Loraine, 2006, Teknik Berkebun Anggur, Kebun Percobaan Banjarsari, Probolinggo, Jawa Timur
19. Kitanaka, S., M. Takido, K. Mizoue, H. Kondo, S. Nakaike (1996), Olgomeric stilbenes from *Caragana chamlagu* Lamark root, *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 565-567
20. Kompas, 25 November 2004, Ny. Loraine Dambakan Kejayaan Anggur lokal
21. Kompas, 26 November 2004, Budidaya Tanaman Anggur (Vitis), Artikel Riset
22. Manahan,D., and Wienberg,R.A., 2002. The Hallmarks of Cancer, *Cell*, **100**, 57-70.
23. Ohyama, M., Tanaka, T., Ito, T., Iinuma, M., Bastow, K.F., dan Lee, K-H (1999). Antitumor agents 2001 cytotoxicity of naturally occuring resveratrol oligomer and their acetate derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**(20), 3057-3060.
24. Oshima, Y., Y. Ueno, K. Hisamichi, M. Takeshita (1993), Ampelopsin F and G, Novel bridged plant oligostilbenes from *Ampelopsis brevipedunculata* var. *hancei* roots (Vitaceae), *Tetrahedron*, **49**, 5801-5804
25. Pastrana-Bonilla, E., Akoh, C.C., Sellapan, S., and Krewer, G., 2003, Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Muscadine Grapes, *J.Agric. Food Chemistry*, **51**, 5497-5503
26. Peter.M.E., Houfelder.A.E., and Heugartner,M.O., 1997. Advance in Apoptosis Research, *Proc. Acad. Sci, USA*, **94** : 12736-12737.
27. Pryce, R.J., P. Langcake (1977), α -Viniferin: an antifungal resveratrol trimer from grapevines, *Phytochemistry*, **16**, 1452-1454

28. Schultz, T.P., Hubbard, T.F., Jin, L-H, Fisher, T.H., dan Nicholas, D.D. (1990). Role of stilbenes in the natural durability of wood fungicidal structure-activity relationship, *Phytochemistry*, **29**(5), 1501-1507.
29. Shapiro, G.I., and Harper, J.W., 1999. Anticancer drug targets : Cell cycle and checkpoint control, *J.Clin.Invest.*, **104**, 1645-53.
30. Sotheeswaran, S. dan Pasupathy, V. (1993). Distribution of Resveratrol Oligomer in Plants, *Phytochemistry*, **32**(5), 1083-1092.
31. Spector, D. 1998. *Cells, A Laboratory Manual, Subcellular Localization of Genes and Their Product, Volume 3.*
32. Sultanbawa, M.U.S., Surendrakumar, S., dan Bladon, P. (1987). Distichol, an antibacterial polyphenol from *Shorea disticha*, *Phytochemistry*, **26**(3), 799-801.
33. Yoshiaki, T. dan Masatake, N. (2001). Oligostilbenes from vitaceaeous plants, *Trends in Heterocyclic Chemistry*, **7**, 41-54.