



LAPORAN PENELITIAN FUNDAMENTAL  
TAHUN ANGGARAN 2007

LAKTON MAKROSIKLIK YANG DIBUAT  
DARI ASAM ANAKARDAT ALAMI:  
AKTIVITAS ANTILEUKEMIA *IN VITRO*

Oleh:

Drs. Marcellino Rudyanto, Apt., MSi., PhD.

Dr. Sutrisno, MSi.

Dra. Suzana, Apt, MSi.

LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT  
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional  
Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Desentralisasi Penelitian

Nomor: 016/SP2H/PP/DP2M/III/2007

Tanggal 29 Maret 2007

Nomor Urut: 7

FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
Tahun 2007

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA



KKB  
Kk-2  
LP. 180/10  
Ruf  
e

LAPORAN PENELITIAN FUNDAMENTAL  
TAHUN ANGGARAN 2007

LAKTON MAKROSIKLIK YANG DIBUAT  
DARI ASAM ANAKARDAT ALAMI:  
AKTIVITAS ANTILEUKEMIA *IN VITRO*

Oleh:

Drs. Marcellino Rudyanto, Apt., MSi., PhD.

Dr. Sutrisno, MSi.

Dra. Suzana, Apt, MSi.

LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT  
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional  
Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Desentralisasi Penelitian

Nomor: 016/SP2H/PP/DP2M/III/2007

Tanggal 29 Maret 2007

Nomor Urut: 7

FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
Tahun 2009





UNIVERSITAS AIRLANGGA  
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

IDENTITAS DAN PENGESAHAN  
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN FUNDAMENTAL

1.	a.	Judul Penelitian	:	Lakton makrosiklik yang dibuat dari asam anakardat alami: aktivitas antileukemia <i>in vitro</i>
	b.	Macam Penelitian	:	(V) Fundamental ( ) Terapan ( ) Pengembangan
	c.	Kategori Penelitian	:	I / II / III
2.		Kepala Proyek Penelitian	:	
	a.	Nama Lengkap	:	Drs. Marcellino Rudyanto, Apt., MSi., PhD.
	b.	Jenis Kelamin	:	Laki-laki
	c.	Pangkat/Golongan dan NIP	:	Pembina / Gol. IVa , NIP. 132 011 702
	d.	Jabatan Sekarang	:	Lektor Kepala
	e.	Fakultas/Jurusan/Puslit	:	Fakultas Farmasi/Departemen Kimia Farmasi
	f.	Univ./Inst./Akademi	:	Universitas Airlangga
	g.	Bidang Ilmu yang Diteliti	:	Kimia Farmasi
3.		Jumlah Tim Peneliti	:	3 (tiga) orang
4.		Lokasi Penelitian	:	Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
5.		Kerjasama dengan Instansi lain	:	
	a.	Nama Instansi	:	
	b.	Alamat	:	
6.		Jangka Waktu Penelitian	:	Satu tahun
7.		Biaya yang Diperlukan	:	Rp. 20.000.000,- (duapuluh juta rupiah)

Mengetahui:  
Dekan Fakultas Farmasi  
Universitas Airlangga,



Prof. Dr. H. Achmad Syahrani, MS.  
NIP. 130 809 077

Surabaya, Desember 2009

Ketua Peneliti,

Drs. M. Rudyanto, Apt., MSi., PhD.  
NIP. 132 011 702

Mengetahui:  
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Unair,



Prof. Dr. Bambang Sektiari L, DEA, drh.  
NIP. 131 837 004

## RINGKASAN

### LAKTON MAKROSIKLIK YANG DIBUAT DARI ASAM ANAKARDAT ALAMI: AKTIVITAS ANTILEUKEMIA *IN VITRO*

Marcellino Rudyanto, Suzana, Sutrisno  
Tahun 2009, 29 halaman

Salah satu bahan alami Indonesia yang tersedia melimpah dan belum dimanfaatkan secara optimal ialah asam anakardat yang terkandung dalam kulit biji mete yang merupakan produk sisa (limbah) agroindustri biji mete. Bila asam anakardat dapat diubah menjadi bahan lain yang berkhasiat sebagai obat maka hal ini akan merupakan sumbangan yang sangat berharga baik bagi ilmu pengetahuan bidang kesehatan maupun bagi peningkatan nilai ekonomi kulit biji mete.

Peneliti telah merancang suatu penelitian bertahap (multi step) untuk mengubah asam anakardat menjadi senyawa-senyawa lakton makrosiklik turunan lasiodiplodin dan secara sistematis memeriksa aktivitas biologis senyawa yang dihasilkan. Diharapkan setelah seluruh tahap diselesaikan akan didapatkan senyawa obat dengan khasiat yang terbukti secara ilmiah.

Tahap pertama dari penelitian multi step ini, yakni transformasi asam anakardat menjadi dua turunan lasiodiplodin melalui delapan tahap reaksi kimia, telah berhasil dilakukan oleh peneliti pada penelitian terdahulu. Peneliti juga telah melakukan uji pendahuluan berupa uji toksisitas terhadap anak udang laut, dan didapatkan bahwa kedua senyawa hasil sintesis bersifat toksik. Oleh karena itu cukup beralasan untuk melanjutkan penelitian ke tahap berikutnya.

Karena telah diketahui bahwa lasiodiplodin bersifat antileukemia, dan bahwa senyawa-senyawa turunan lasiodiplodin yang disintesis memenuhi struktur umum senyawa makrolakton berkhasiat antikanker sebagaimana dinyatakan oleh Lewis (2003) dan Wu (2002), maka pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas antileukemia terhadap senyawa-senyawa turunan lasiodiplodin tersebut.

Penelitian ini bertujuan mengungkap aktivitas dua senyawa makrolakton hasil sintesis berupa sitotoksitas terhadap sel leukemia, dengan penentuan sifat sitotoksik berdasarkan harga  $LC_{50}$ . Penentuan sifat keaktifan didasarkan pada pedoman National Cancer Institute, yang menyatakan suatu senyawa dianggap aktif bila mempunyai  $LC_{50} < 4$  mg/mL untuk senyawa murni dan  $< 20$  mg untuk ekstrak.

Demetildehidroksilasiiodiplodin (lakton A) dan dehidroksilasiiodiplodin (lakton B) dengan berbagai konsentrasi ditambahkan ke dalam kultur sel myeloma dan kultur sel P388 di dalam microplate. Setelah diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> yang berisi 95% O<sub>2</sub> dan 5% CO<sub>2</sub> dengan suhu 37 °C selama 24 jam, *optical density* diamati dengan *elisa reader*.

Dari pengujian yang dilakukan didapat nilai LC<sub>50</sub> dehidroksidemetilasiiodiplodin (lakton A) dan dehydroxylasiiodiplodin (lakton B) terhadap sel mieloma mencit berturut-turut ialah 39,34 dan 32,99 mg/L, sedangkan terhadap sel P388 berturut-turut ialah 14,25 dan 14,50 mg/L. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa kedua senyawa tidak bersifat anti kanker terhadap sel mieloma mencit dan sel leukemia P388.

Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.  
Nomor Kontrak: 016/SP2H/PP/DP2M/III/2007

## SUMMARY

### MACROCYCLIC LACTONE PREPARED FROM NATURAL ANACARDIC ACID: *IN VITRO* ANTILEUKEMIC ACTIVITY

Marcellino Rudyanto, Suzana, Sutrisno  
Year 2009, 29 pages

One of natural products that are available in abundant quantity yet not optimally utilized is anacardic acid. This compound is found in cashew nut-shell which is a waste product of cashew agro-industry. It will be a invaluable contribution to both health science and economic value of the cashew nut-shell if anacardic acid can be converted to another substance having activity as medicine.

The authors planned a multi-step research to convert anacardic acid to macrocyclic lactones having lasiodiplodin basic framework, and systematically check the biological activity of the obtained compounds. Hopefully, after finishing all the steps, new medicines which activity is scientifically proven will be obtained.

The first step of the multi-step research, i.e. transformation of anacardic acid to two lasiodiplodin derivatives has been accomplished by the authors in the previous research. A preliminary study, i.e. toxicity on brine shrimp, has also been done, and it was found that both of the substances are toxic. Therefore, it is quite reasonable to continue the research to the next step.

Since it is known that lasiodiplodin has antileukemic activity, and the fact that synthesized lasiodiplodin derivatives have common structure of anticancer macrolactones, then antileukemic activity of the lasiodiplodin derivatives was studied in this research.

This research is aimed to reveal the cytotoxicity of the two macrolactones to leukemia cell by measuring the  $LC_{50}$ . A guidance from National Cancer Institute is used to consider the activity. According to the guidance, a substance is considered active if the  $LC_{50}$  is less than 4 mg/mL for pure compound and less than 20 mg/mL for an extract.

Demethyldehydroxylasiodiplodin (lactone A) and dehydroxylasiodiplodin (lactone B) in various concentration were added to myeloma and P388 cell cultures in microplates. After incubating in  $CO_2$  incubator containing 95%  $O_2$  and 5%  $CO_2$  at 37 °C for 24 hours, optical density was measured with elisa reader.

It was found that the  $LC_{50}$  of demethyldehydroxylasioplodir (lactone A) and dehydroxylasioplodin (lactone B) against myeloma cell are 39.34 mg/L and 32.99 mg/L, respectively, while the  $LC_{50}$  against P388 cell are 14.25 mg/L and 14.50 mg/L, respectively. As conclusion, both of the lactones have no anticancer activity against myeloma and P388 cells.

Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Airlangga University.  
Contract Number: 016/SP2H/PP/DP2M/III/2007

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa, karena hanya atas limpahan rahmat karunianya maka laporan Penelitian Fundamental yang berjudul “Lakton makrosiklik yang dibuat dari asam anakardat alami: aktivitas antileukemia in vitro” ini dapat terselesaikan.

Penelitian ini dapat telaksana atas kerjasama, bantuan, dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu dengan segala ketulusan hati disampaikan terima kasih kepada:

1. Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, yang telah mendanai penelitian ini melalui program Penelitian Fundamental tahun 2007.
2. Rektor Universitas Airlangga atas ijin, fasilitas dan dorongan yang diberikan kepada staf akademik untuk melakukan penelitian.
3. Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Airlangga, atas segala bantuan dan fasilitas yang diberikan sejak tahap penyiapan usulan penelitian hingga terselesaikannya penelitian ini.
4. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, atas ijin dan fasilitas yang diberikan untuk melakukan penelitian ini.
5. Pimpinan dan staf Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada atas bantuan yang diberikan dalam pengujian terhadap sel myeloma.
6. Kelompok peneliti Kimia Organik Bahan Alam, Jurusan Kimia Institut Teknologi Bandung atas bantuan yang diberikan dalam pengujian terhadap sel P388.
7. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, atas segala bentuk dukungan yang diberikan kepada peneliti.

Akhirnya, penulis berharap penelitian ini dapat memberikan sumbangan yang berarti kepada ilmu pengetahuan pada umumnya dan bagi pembangunan nasional pada khususnya.

Surabaya, Juli 2009

Penulis



DAFTAR ISI

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN .....	ii
RINGKASAN .....	iii
SUMMARY .....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
DAFTAR ISI .....	vi
DAFTAR TABEL .....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	viii
I. PENDAHULUAN .....	1
II. TINJAUAN PUSTAKA .....	3
III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN .....	10
IV. METODE PENELITIAN .....	11
V. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	15
VI. KESIMPULAN DAN SARAN .....	27
DAFTAR PUSTAKA .....	28

## DAFTAR TABEL

Tabel II.1	Toksisitas Makrolakton terhadap <i>Artemia salina</i>	7
Tabel II.2	Empat Kategori Utama Leukemia	9
Tabel IV.1	Pembuatan larutan uji	12
Tabel IV.2	Pembuatan larutan uji untuk doubling time	14
Tabel V.1	Hasil pengamatan uji sitotoksisitas lakton A	15
Tabel V.2	Persen kematian sel karena lakton A	15
Tabel V.3	Hasil pengamatan uji sitotoksisitas lakton B	17
Tabel V.4	Persen kematian sel karena lakton B	17
Tabel V.5	Hasil pengamatan uji sitotoksisitas DMSO	19
Tabel V.6	Persen kematian sel karena DMSO	20
Tabel V.7	Hasil pengamatan doubling time lakton A setelah 24 jam	20
Tabel V.8	Hasil pengamatan doubling time lakton A setelah 48 jam	21
Tabel V.9	Hasil pengamatan doubling time lakton A setelah 72 jam	21
Tabel V.10	Hasil pengamatan doubling time lakton B setelah 24 jam	22
Tabel V.11	Hasil pengamatan doubling time lakton B setelah 48 jam	22
Tabel V.12	Hasil pengamatan doubling time lakton B setelah 72 jam	22
Tabel V.13	Hasil pengamatan doubling time DMSO setelah 24 jam	23
Tabel V.14	Hasil pengamatan doubling time DMSO setelah 48 jam	23
Tabel V.15	Hasil pengamatan doubling time DMSO setelah 72 jam	23
Tabel V.16	Hasil Uji Doubling Time Lakton A	24
Tabel V.17	Hasil Uji Doubling Time Lakton B	25
Tabel V.18	Toksisitas senyawa uji terhadap sel P388	26

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Asam-asam anakardat dari jambu mete	4
Gambar 2.2	Lasiodiplodin dan turunan sintetiknya	5
Gambar 2.3	Struktur umum lakton anti kanker	5
Gambar 2.4	Sintesis turunan lasiodiplodin	7
Gambar 5.1	Grafik persen kematian vs konsentrasi lakton A	16
Gambar 5.2	Grafik persen kematian vs konsentrasi lakton B	18
Gambar 5.3	Hasil uji doubling time untuk lakton A	24
Gambar 5.4	Hasil uji doubling time untuk lakton B	25

## BAB I

### PENDAHULUAN

Salah satu masalah kesehatan dunia adalah kanker. Pada tahun 2000 sebanyak 6,2 juta orang meninggal karena kanker dan diperkirakan hingga tahun 2020 akan terjadi 15 juta kasus baru (WHO, 2003). Diperkirakan insiden kanker di Indonesia adalah 100 kasus per 100.000 penduduk (Dalimartha, 1999). Dengan demikian penting dilakukan upaya pengembangan obat antikanker baru.

Salah satu strategi penting dalam pengembangan obat baru ialah melalui modifikasi struktur molekul senyawa yang telah diketahui (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Salah satu bahan alami Indonesia yang tersedia melimpah dan belum dimanfaatkan secara optimal ialah asam anakardat yang terkandung dalam kulit biji mete yang merupakan produk sisa (limbah) agroindustri biji mete. Bila asam anakardat dapat diubah menjadi bahan lain yang berkhasiat sebagai obat maka hal ini akan merupakan sumbangan yang sangat berharga baik bagi ilmu pengetahuan bidang kesehatan maupun bagi peningkatan nilai ekonomi kulit biji mete.

Peneliti telah merancang suatu penelitian bertahap (*multi step*) untuk mengubah asam anakardat menjadi senyawa-senyawa lakton makrosiklik turunan lasiodiplodin dan secara sistematis memeriksa aktivitas biologis senyawa yang dihasilkan. Diharapkan setelah seluruh tahap diselesaikan akan didapatkan senyawa obat dengan khasiat yang terbukti secara ilmiah.

Tahap pertama dari penelitian multi step ini, yakni transformasi asam anakardat menjadi dua turunan lasiodiplodin melalui delapan tahap reaksi kimia, telah berhasil dilakukan oleh peneliti dengan dana *ITSF Research Grant* pada tahun 2005. Peneliti juga telah melakukan uji pendahuluan berupa uji toksisitas terhadap anak udang laut, dan didapatkan bahwa kedua senyawa hasil sintesis bersifat toksik [Rudyanto, 2006a; Rudyanto, 2006b]. Oleh karena itu cukup beralasan untuk melanjutkan penelitian ke tahap berikutnya.

Karena telah diketahui bahwa lasiodiplodin bersifat antileukemia, dan bahwa senyawa-senyawa turunan lasiodiplodin yang disintesis memenuhi struktur umum senyawa makrolakton berkhasiat antikanker sebagaimana dinyatakan oleh Lewis (2003) dan Wu (2002), maka pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas antileukemia terhadap senyawa-senyawa turunan lasiodiplodin tersebut.

Uji aktivitas berupa sifat sitotoksik kedua senyawa makrolakton hasil sintesis dilakukan terhadap sel leukemia P388 dan sel mieloma. Penentuan sifat sitotoksik didasarkan pada harga  $LC_{50}$ . Penentuan sifat keaktifan didasarkan pada pedoman *National Cancer Institute*, yang menyatakan suatu senyawa dianggap aktif bila mempunyai  $LC_{50} < 4$  mg/mL untuk senyawa murni dan  $< 20$  mg untuk ekstrak.

Penelitian ini diharapkan akan memberikan sumbangan mendasar bagi ilmu pengetahuan berupa pengetahuan baru mengenai aktivitas sitotoksik in vitro dari senyawa demetildehidroksilasiiodiplodin dan dehidroksilasiiodiplodin terhadap sel P388 dan sel mieloma. Pengetahuan baru tersebut diharapkan dapat **menjadi dasar** bagi penelitian dan pengembangan lebih lanjut terhadap senyawa-senyawa lakton makrosiklik yang telah disintesis sebagai obat baru yang berkhasiat anti kanker.

### **Rumusan masalah**

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas dirumuskan permasalahan penelitian ini sebagai berikut:

- Apakah makrolakton A dan B aktif sebagai senyawa anti kanker?



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### **2.1 Pentingnya pengembangan obat antikanker**

Pada tahun 2000 dilaporkan sebanyak 6,2 juta orang meninggal karena kanker. Kanker menjadi penyebab 12% dari total 56 juta kematian di dunia [WHO, 2003]. Menurut *World Cancer Report*, penelitian global yang paling komprehensif mengenai penyakit kanker, insiden kanker akan terus meningkat hingga 50% dan akan terjadi 15 juta kasus baru pada tahun 2020. Di Indonesia, kanker juga merupakan penyakit yang ditakuti karena seringkali berakhir dengan kematian. Insiden kanker di Indonesia diperkirakan 100 kasus per 100.000 penduduk per tahun atau sekitar 200.000 kasus per tahun. Pada survey kesehatan rumah tangga yang diselenggarakan oleh Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, ditemukan bahwa 1,4% dari seluruh kematian disebabkan oleh kanker. Angka ini meningkat menjadi 3,4% pada tahun 1980 dan 4,3% pada tahun 1986 [Dalimartha, 1999].

Kemoterapi merupakan salah satu metode penting dalam penanganan kanker. Penggunaan obat antikanker seringkali kurang memberikan hasil yang memuaskan, baik karena efektivitas dan selektivitasnya yang kurang ataupun karena adanya efek samping yang ditimbulkan, sehingga upaya pengembangan obat antikanker baru merupakan hal yang sangat penting untuk dilakukan. Penelitian ini merupakan upaya pengembangan antikanker baru.

#### **2.2 Strategi pengembangan obat: modifikasi struktur**

Modifikasi struktur molekul senyawa yang telah diketahui aktivitas biologisnya merupakan salah satu strategi dalam pengembangan obat. Modifikasi tersebut bertujuan untuk mendapatkan senyawa baru yang mempunyai aktivitas lebih tinggi, masa kerja yang lebih panjang, tingkat kenyamanan yang lebih tinggi, toksisitas atau efek samping yang lebih rendah, lebih selektif dan lebih stabil [Siswandono dan Soekardjo, 2000]. Dalam penelitian ini, pengembangan antikanker baru dilakukan melalui modifikasi struktur senyawa yang sudah diketahui.

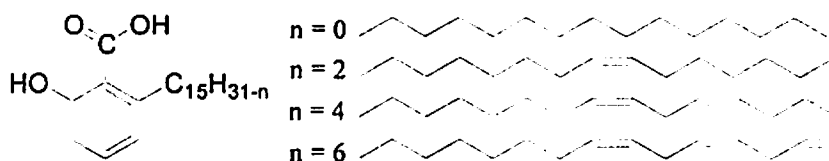
#### **2.3 Asam anakardat: bahan alam yang belum dimanfaatkan secara optimal**

Indonesia adalah negeri yang kaya akan sumber alam. Salah satu sumber alam yang melimpah dan masih perlu dikembangkan kemanfaatannya adalah senyawa-senyawa

alami yang terdapat dalam tumbuhan. Jambu mete (*Anacardium occidentale* Linn.) merupakan tanaman yang banyak terdapat di Indonesia. Meskipun bukan merupakan tanaman asli Indonesia, biji tanaman ini telah menjadi komoditas ekspor non migas yang penting bagi Indonesia. Pada tahun 2000 Indonesia mengekspor 5.327.180 Kg biji mete tanpa kulit dan 201.539.920 Kg biji mete utuh, dengan nilai total USD 134.240.172 [Bank Indonesia, 2005]. Menurut data F.A.O. Indonesia memproduksi 5% dari total produksi mete dunia dan merupakan produsen terbesar ke lima setelah Brasil, India, Mozambique dan Guineabissau [Mark's Fruit Crops Homepage, 2003].

Di Indonesia, proses pengolahan biji mete sebagian besar masih dilakukan secara tradisional/manual, yakni dengan membelah kulit biji mete dengan menggunakan kaciap untuk mendapatkan bijinya. Konsekuensi dari produksi mete dalam skala besar adalah adanya produk sisa (limbah) berupa kulit biji mete dalam jumlah besar pula. Masyarakat pada umumnya memanfaatkan produk sisa ini sebagai bahan bakar [Rudyanto, 2004].

Kandungan utama (40-50% berat) kulit biji jambu mete ialah minyak fenolik yang disebut *cashew nut shell liquid (CNSL)*. CNSL alami (yang diperoleh tanpa proses pemanasan) mengandung lebih dari 70% asam anakardat (Gambar 2.1) [Tyman, 1980]. Dengan demikian asam anakardat merupakan senyawa bahan alam yang tersedia dalam jumlah melimpah.



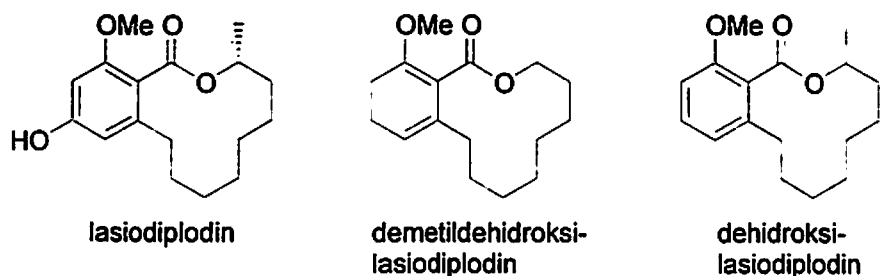
Gambar 2.1 Asam-asam anakardat dari jambu mete

#### 2.4 Peluang memodifikasi struktur asam anakardat menjadi lakton makrosiklik antikanker

Lasiodiplodin (Gambar 2.2) adalah lakton makrosiklik yang pertama kali diisolasi dari *Lasiodiplodia theobromae* [Turner, 1971]. Kemudian senyawa ini juga diketahui terdapat pada *Euphorbia splendens* dan diketahui memiliki aktivitas antileukemia [Lee, 1982].

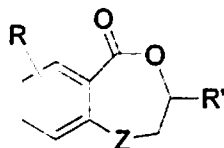
Karena adanya bagian-bagian struktur yang mirip antara asam anakardat dan lasiodiplodin, maka bila rantai samping asam anakardat yang terdiri atas 15 atom

karbon dipotong hingga tersisa 8 atom karbon kemudian dilakukan reaksi esterifikasi intramolekuler maka akan dapat dibuat turunan lasiodiplodin seperti digambarkan pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Lasiodiplodin dan turunan sintetikya

Senyawa makrolakton aromatik yang memiliki struktur umum seperti terlihat pada Gambar 2.3, seperti apikularen A [Lewis dkk, 2003], salisilhalamida A [Wu dkk, 2002] dan lasiodiplodin [Santos dan Magehaes, 1999] merupakan senyawa-senyawa alami yang memiliki aktivitas antikanker. Turunan-turunan sintetik senyawa-senyawa tersebut juga dikenal memiliki aktivitas antikanker [Bhattacharjee dkk, 2001; Wu dkk, 2000]. Oleh karena itu meskipun demetildehidroksilasiiodiplodin dan dehidroksilasiiodiplodin [Gambar 2.2] tidak memiliki gugus hidroksil pada cincin aromatis seperti pada lasiodiplodin, besar kemungkinan kedua senyawa turunan tersebut juga memiliki aktivitas antikanker. Tidak adanya gugus hidroksil akan meningkatkan sifat lipofilitas senyawa sehingga akan meningkatkan kemampuannya untuk menembus membran sel.



Gambar 2.3 Struktur umum lakton anti kanker

Bila kedua senyawa turunan lasiodiplodin tersebut dapat disintesis dari asam anakardat, dan bila senyawa turunan tersebut dapat digunakan sebagai obat antikanker, maka akan timbul peluang yang besar untuk meningkatkan nilai ekonomi kulit biji mete yang tersedia dalam jumlah besar dan harga murah.

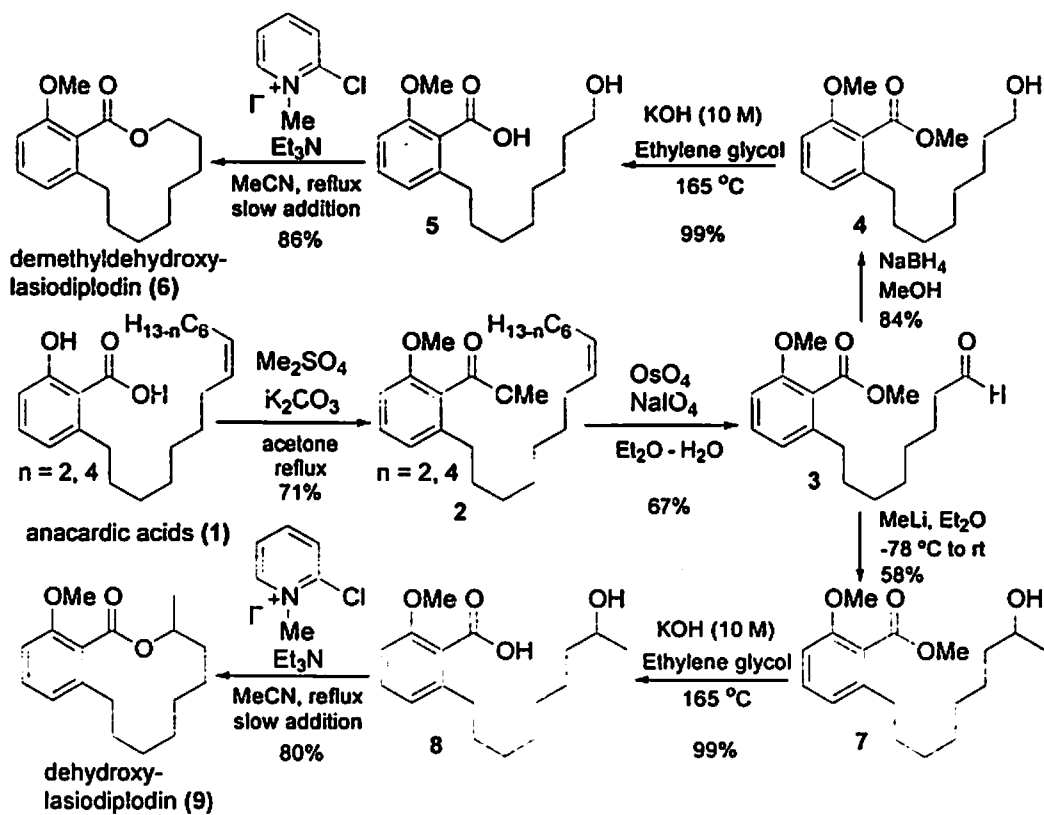
## 2.5 Sintesis turunan-turunan lasiodiplodin dari asam anakardat

Sebagai tahap pertama dari penelitian multi tahap yang dirancang oleh peneliti, telah berhasil disintesis dua lakton makrosiklik turunan dari lasiodiplodin, yakni demetildehidroksilasiodiplodin dan dehidroksilasiodiplodin dari bahan awal asam anakardat yang diisolasi dari kulit biji mete. Penelitian tersebut dilaksanakan pada tahun 2005 dan didanai oleh *Indonesia Toray Science Foundation* melalui *11<sup>th</sup> ITSF Research Grant*. Pengusul juga telah menguji toksisitas senyawa-senyawa yang didapatkan terhadap larva *Artemia salina* [Rudyanto, 2006a; Rudyanto, 2006b].

Sintesis dua turunan lasiodiplodin dilakukan masing-masing melalui lima tahap reaksi sebagaimana tercantum pada Gambar 2.4. Mula-mula asam anakardat (1) diubah menjadi dimetil anakardat ester eter (2) dengan cara merefluks asam anakardat bersama dimetilsulfat dan kalium karbonat dalam pelarut aseton. Selanjutnya dilakukan reaksi pemutusan oksidatif terhadap ikatan rangkap rantai samping dengan pereaksi natriumperiodat dan katalis osmium tetraoksida dalam sistem dua fasa eter-air, menghasilkan aldehida (3).

Pada tahap berikutnya dilakukan reduksi gugus aldehida menjadi alkohol (4) dengan pereaksi natrium borohidrida dalam pelarut metanol, kemudian gugus ester pada (4) dihidrolisis dengan kalium hidroksida dalam etilena glikol menjadi asam karboksilat (5). Reaksi makrolaktonisasi Mukaiyama yang dilakukan dengan meneteskan lambat larutan asam hidroksi karboksilat ke dalam larutan garam Mukaiyama dalam asetonitril selama periode sepuluh jam menghasilkan demetildehidroksilasiodiplodin (6).

Turunan kedua disintesis dari aldehida (3) dengan memasukkan gugus metil nukleofilik menghasilkan alkohol sekunder (4). Kemoselektivitas pada reaksi ini dikendalikan dengan melakukan reaksi pada suhu  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Selanjutnya dilakukan hidrolisis dan siklisasi dengan cara yang sama dengan turunan pertama, menghasilkan dehidroksilasiodiplodin (9).



Gambar 2.4 Sintesis turunan lasiodiplodin

Terhadap dua senyawa turunan lasiodiplodin yang disintesis telah dilakukan uji aktivitas biologis pendahuluan berupa uji toksisitas terhadap larva *Artemia salina*, hasilnya adalah sebagai berikut (Tabel II.1).

Tabel II.1

Toksitas Makrolakton terhadap *Artemia salina*

Senyawa	LC <sub>50</sub> (ppm)
<p>6</p>	175
<p>9</p>	169



Berdasarkan fakta bahwa toksisitas terhadap larva udang memiliki korelasi positif dengan aktivitas anti kanker [McLaughlin, 1998] dan bahwa struktur senyawa turunan yang dibuat memenuhi struktur umum senyawa makrolakton yang bersifat antikanker, maka perlu dilakukan penelitian mengenai aktivitas senyawa-senyawa tersebut terhadap berbagai sel kanker. Karena diketahui bahwa lasiodiplodin aktif menghambat pertumbuhan sel leukemia, maka pada penelitian ini akan dilakukan uji dengan menggunakan sel leukemia.

## 2.6 Tinjauan tentang leukemia

Kata leukemia berasal dari kata-kata Yunani leukos yang berarti putih dan aima yang berarti darah. Leukemia ialah kanker darah atau sumsum tulang yang ditunjukkan dengan perbanyakan yang abnormal dari sel darah, biasanya sel darah putik (leukosit). Leukemia merupakan istilah mewakili spektrum penyakit yang luas, dan merupakan bagian dari kelompok penyakit yang lebih besar yang disebut neoplasma hematologis (Wikipedia, 2008).

Secara klinis dan patologis leukemia dibagi ke dalam beberapa kelompok besar. Pembagian pertama berdasarkan bentuk akut dan kronis:

- Leukemia akut ditunjukkan dengan peningkatan yang cepat dari sel darah yang belum matang. Peningkatan tersebut menyebabkan sumsum tidak dapat memproduksi sel darah yang sehat. Perjalanan penyakit ini sangat cepat. Leukemia akut merupakan jenis leukemia yang banyak terjadi pada anak.
- Leukemia kronis ditunjukkan dengan pembentukan yang berlebih dari sel darah yang relatif matang tetapi masih abnormal. Perjalanan penyakit ini lebih lambat, beberapa bulan sampai beberapa tahun. Leukemia jenis ini kebanyakan dialami oleh orang dewasa, tetapi secara teoritis dapat terjadi pada segala kelompok usia.

Leukemia juga dapat digolongkan berdasarkan jenis sel darah yang terpengaruhi, yakni leukemia limfoblastik (atau limfositik) dan leukemia myeloid (atau myelogenous):

- Pada leukemia limfoblastik (atau limfositik), kanker terjadi pada jenis sumsum yang pada keadaan normal membentuk limfosit, yang merupakan sel sistem imun pelawan infeksi.
- Pada leukemia myeloid (atau myelogenous), kanker terjadi pada jenis sumsum yang pada keadaan normal membentuk sel darah merah, beberapa jenis sel darah putih dan platelet.

Penggabungan dua klasifikasi tersebut di atas menghasilkan empat kategori utama leukemia, seperti ditunjukkan pada tabel berikut.

**Tabel II.2**  
**Empat Kategori Utama Leukemia**

<b>Jenis sel</b>	<b>Akut</b>	<b>Kronis</b>
Leukemia limfositik (limfoblastik)	Leukemia limfoblastik akut	Leukemia limfositik kronik
Leukemia myelogenus (myeloid atau non limfositik)	Leukemia myelogenus akut	Leukemia myelogenus kronis

Di samping pembagian ke dalam empat kategori utama di atas masih ada pembagian lebih lanjut ke dalam sub-sub kategori (Wikipedia, 2008).

## BAB III

### TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

#### 3.1 Tujuan penelitian

Penelitian ini bertujuan mengungkap aktivitas dua senyawa makrolakton hasil sintesis berupa sitotoksisitas terhadap sel leukemia. Untuk uji ini digunakan metode Fujimoto yang telah dimodifikasi (Sutrisno, 2000), dengan penentuan sifat sitotoksik berdasarkan harga  $LC_{50}$ . Penentuan sifat keaktifan didasarkan pada pedoman National Cancer Institute, yang menyatakan suatu senyawa dianggap aktif bila mempunyai  $LC_{50} < 4$  mg/mL untuk senyawa murni dan  $< 20$  mg untuk ekstrak.

#### 3.2 Manfaat penelitian

Penelitian ini memberi pengetahuan baru mengenai aktivitas sitotoksik *in vitro* dari senyawa demetildehidroksilasiodiplodin dan dehidroksilasiodiplodin terhadap sel leukemia. Pengetahuan yang didapat dari penelitian ini akan menjadi dasar bagi penelitian dan pengembangan lebih lanjut terhadap senyawa-senyawa lakton makrosiklik tersebut di atas sebagai obat baru yang berkhasiat anti kanker.

## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Bahan**

Bahan uji berupa kristal demetildehidrosilasiiodiplodin dan dehidrosilasiiodiplodin didapat dari penelitian sebelumnya.

Bahan-bahan kimia untuk uji toksisitas terhadap sel mieloma mencit dan sel P388 meliputi RPMI 1640 (Nissui Jepang), FBS : Fetal Bovine Serum (Gibco), MTT : 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromida (Sigma), SDS : Sodium dodescyl sulfat (Merck), Kanamycin Sulfat (Meiji Jepang), PBS : Phosphoric acid buffer solution (Nissui Jepang), DMSO : Dimetil Sulfokside (Merck).

#### **4.2 Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi microplate 96, elisa reader, inkubator CO<sub>2</sub>, mikroskop, laminar air flow, dan alat-alat gelas yang lazim digunakan di laboratorium.

#### **4.3 Prosedur uji sitotoksitas terhadap sel mieloma**

##### **4.3.1 Pembuatan larutan stok 2000 µg/ml**

1. Ditimbang lakton A dan lakton B masing-masing sebanyak 5 mg.
2. Masing-masing lakton dilarutkan dalam 100 µl DMSO.
3. Ke dalam masing-masing larutan ditambahkan RPMI hingga volume 2,5 ml.
4. Larutan induk disimpan pada suhu -20 °C

##### **4.3.2 Pembuatan larutan stok 200 µg/ml**

1. Diambil larutan stok lakton A dan lakton B 2000 µg/ml masing-masing sebanyak 250 µl.
2. Masing-masing diencerkan dengan RPMI hingga volume 2500 µl.

##### **4.3.3 Pembuatan larutan uji**

Untuk pengujian pada konsentrasi 20-60 µg/ml dibuat larutan uji dengan konsentrasi 40-120 µg/ml dengan cara mengencerkan larutan stok 200 µl menggunakan RPMI sesuai dengan perbandingan pada tabel berikut:

**Tabel IV.1**  
**Pembuatan larutan uji**

No.	Konsentrasi pengujian ( $\mu\text{g/ml}$ )	Konsentrasi larutan sampel ( $\mu\text{g/ml}$ )	Volume larutan stok ( $\mu\text{l}$ )	Volume RPMI ( $\mu\text{l}$ )
1.	60	120	480	320
2.	55	110	440	360
3.	50	100	400	400
4.	45	90	360	440
5.	40	80	320	480
6.	35	70	280	520
7.	30	60	240	560
8.	25	50	200	600
9.	20	40	160	640

**4.3.4 Pembuatan suspensi sel mieloma  $2,0 \times 10^6$  sel/ml**

1. Diambil suspensi sel dari stok (kadar  $86,25 \times 10^4$  sel) sebanyak 3,48 ml.
2. Diencerkan dengan media RPMI hingga volume 15 ml.

**4.3.5 Uji sitotoksitas senyawa uji**

**4.3.5.1 Sediaan C (senyawa uji + media + sel mieloma)**

1. Setiap well yang digunakan untuk pengujian diisi dengan 100  $\mu\text{l}$  suspensi sel sehingga pada masing-masing well terdapat  $2 \times 10^4$  sel.
2. Ke dalam setiap well yang sudah terisi suspensi sel ditambahkan 100  $\mu\text{l}$  larutan uji dengan konsentrasi 40-120  $\mu\text{g/ml}$  sehingga konsentrasi senyawa uji dalam sediaan ialah 20-60  $\mu\text{g/ml}$  (Tabel I).

**4.3.5.2 Sediaan D (senyawa uji + media)**

1. Setiap well yang digunakan untuk pengujian diisi dengan 100  $\mu\text{l}$  media RPMI.
2. Ke dalam setiap well tersebut ditambahkan 100  $\mu\text{l}$  larutan uji dengan konsentrasi 40-120  $\mu\text{g/ml}$  sehingga konsentrasi senyawa uji dalam sediaan ialah 20-60  $\mu\text{g/ml}$  (Tabel I).

**4.3.5.3 Sediaan A (media + sel mieloma)**

1. Setiap well yang digunakan untuk pengujian diisi dengan 100  $\mu\text{l}$  suspensi sel sehingga pada masing-masing well terdapat  $2 \times 10^4$  sel.
2. Ke dalam setiap well tersebut ditambahkan 100  $\mu\text{l}$  media RPMI.



#### 4.3.5.4 Sediaan D (media saja)

1. Setiap well yang digunakan untuk pengujian diisi dengan 200  $\mu$ l media RPMI.

#### 4.3.5.5 Inkubasi

1. Sediaan A, B, C dan D diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> yang berisi 95% O<sub>2</sub> dan 5% CO<sub>2</sub> dengan suhu 37 °C selama 24 jam

#### 4.3.5.6 Pengamatan hasil uji sitotoksitas

1. Ke dalam setiap well ditambahkan 10  $\mu$ l MTT 5 mg/ml.
2. Dimasukkan kembali ke dalam inkubator selama 4 jam.
3. Ke dalam masing-masing well ditambahkan larutan stopping, yaitu 100  $\mu$ l larutan 10% SDS dalam 0,01 N HCl.
4. Diamati dengan elisa reader pada panjang gelombang 550 nm.

#### 4.3.6 Uji sitotoksitas DMSO

Pengujian toksisitas DMSO dilakukan dengan mengganti larutan stok 2000  $\mu$ g/ml pada 4.3.1 dengan larutan DMSO dalam RPMI.

1. Diambil 100  $\mu$ l DMSO, kemudian ditambahkan media RPMI hingga volume 2,5 ml.
2. Dari larutan di atas diambil 250  $\mu$ l, kemudian diencerkan dengan RPMI hingga volume 2500  $\mu$ l.
3. Terhadap larutan di atas dilakukan pengenceran sesuai Tabel 1.
4. Selanjutnya dilakukan pengujian dengan prosedur seperti pada 4.3.5.

#### 4.3.7 Uji doubling time

Untuk pengujian doubling time dibuat larutan lakton A dan B masing-masing pada konsentrasi 20-60  $\mu$ g/ml dibuat larutan uji dengan konsentrasi 35-45  $\mu$ g/ml dengan cara mengencerkan larutan stok 200  $\mu$ l menggunakan RPMI sesuai dengan perbandingan seperti pada tabel berikut:

Tabel IV.2

Pembuatan larutan uji untuk doubling time

No.	Konsentrasi pengujian ( $\mu\text{g/ml}$ )	Konsentrasi larutan sampel ( $\mu\text{g/ml}$ )	Volume larutan stok ( $\mu\text{l}$ )	Volume RPMI ( $\mu\text{l}$ )
1.	45	90	810	990
2.	42,5	85	765	1035
3.	40	80	720	1080
4.	37,5	75	675	1125
5.	35	70	630	1170

Selanjutnya dilakukan seperti pada 4.3.4 – 4.3.6. Pengamatan dilakukan setelah inkubasi selama 24, 48 dan 72 jam.

#### 4.4 Prosedur uji sitotoksisitas terhadap sel P388

Pengujian sitotoksisitas terhadap sel P388 dilakukan sesuai prosedur sebagai berikut.

Pada semua tahap dilakukan triplo.

1. Sel P388 dibiarkan dalam media RPMI 1640 dilengkapi dengan 5% FBS (Fetal Bovine Serum) dan kanamisin ( $100 \mu\text{g/ml}$ ).
2. Sel ( $3 \times 10^3$  sel/sumur) dikultur dalam mikroplate mengandung  $100 \mu\text{L}$  media pertumbuhan per sumur dan diinkubasi pada  $37^{\circ}\text{C}$  dgn kelembaban 5%  $\text{CO}_2$ .
3. Sampel ( $10 \mu\text{L}$ ) dengan berbagai konsentrasi dalam DMSO ditambahkan ke dalam kultur sehari setelah transplantasi.
4. Pada hari ke 3 ditambahkan  $20 \mu\text{L}$  larutan MTT ( $5\text{mg/mL}$ ) per sumur ke dalam tiap media kultur. Setelah 4 jam inkubasi ditambahkan  $100 \mu\text{L}$  larutan 10% SDS-0,01N HCl ke dalam tiap sumur, diaduk dengan menggunakan mikropipet.
5. Setelah diinkubasi selama 24 jam maka dilakukan pengukuran *optical density* menggunakan *microplate reader* pada dua daerah panjang gelombang (550 dan 700 nm).

## BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Sitotoksitas terhadap sel mieloma

#### 5.1.1 Hasil uji sitotoksitas lakton A

Hasil pengamatan dengan menggunakan elisa reader terhadap sediaan-sediaan yang telah diinkubasi selama 24 jam tercantum pada Tabel V.1 di bawah ini.

**Tabel V.1**

**Hasil pengamatan uji sitotoksitas lakton A**

Kadar (µg/ml)	Lakton A + Media + Sel (Sediaan C)				Lakton A + Media (Sediaan D)			
	I	II	III	Rerata	I	II	III	Rerata
60	0,470	0,492	0,478	0,480	0,480	0,483	0,508	0,490
55	0,490	0,485	0,461	0,479	0,462	0,444	0,489	0,465
50	0,485	0,469	0,464	0,473	0,467	0,474	0,498	0,480
45	0,494	0,483	0,481	0,486	0,470	0,472	0,495	0,479
40	0,743	0,695	0,693	0,710	0,472	0,467	0,488	0,476
35	0,931	0,881	0,833	0,882	0,471	0,461	0,498	0,477
30	1,042	1,001	0,987	1,010	0,470	0,468	0,503	0,480
25	1,133	1,109	1,049	1,097	0,471	0,467	0,499	0,479
20	1,168	1,117	1,165	1,150	0,474	0,468	0,492	0,478
	Media + Sel (Sediaan A)				Media saja (Sediaan B)			
	I	II	III	Rerata	I	II	III	Rerata
	1,001	1,014	0,977	0,997	0,480	0,474	0,495	0,483

Setelah dilakukan perhitungan persen kematian dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Kematian} = \frac{(A - B) - (C - D)}{(A - B)} \times 100 \%$$

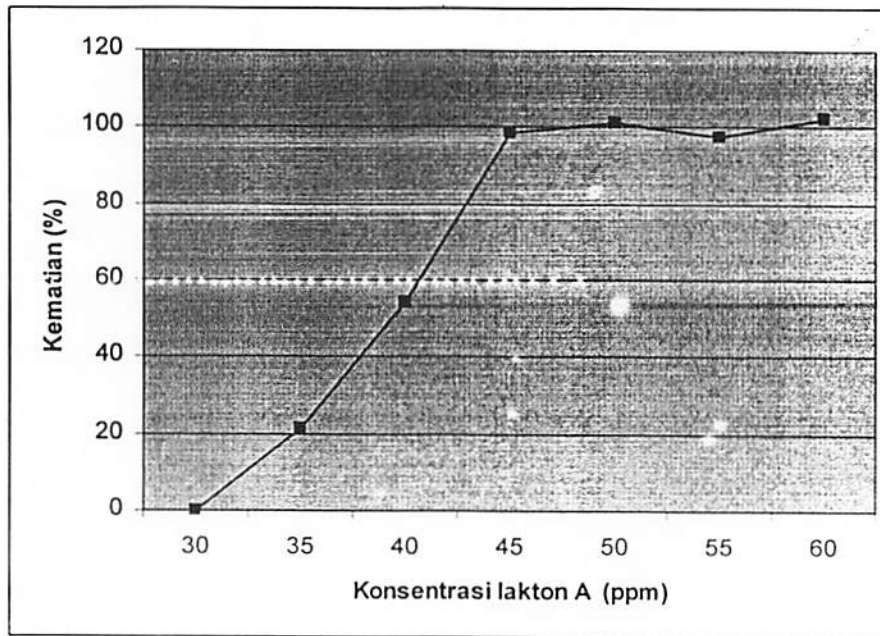
maka didapat persen kematian untuk setiap konsentrasi seperti tercantum pada Tabel V.2.

**Tabel V.2**

**Persen kematian sel karena lakton A**

Kadar (µg/ml)	Kematian (%)
60	102,01
55	97,34
50	101,36
45	98,64
40	54,38
35	21,26
30	- 2,98
25	- 20,16
20	- 30,66

Bila data kematian sel karena lakton A tersebut disajikan dalam bentuk grafik maka akan tampak sebagai berikut.



Gambar 5.1 Grafik persen kematian vs konsentrasi lakton A

Dari grafik di atas terlihat bahwa pada kadar lakton A 45 ppm seluruh sel mengalami kematian, sedangkan kadar yang menyebabkan kematian pada 50% sel ( $LC_{50}$ ) berada di antara 35 dan 40 ppm. Perhitungan  $LC_{50}$  untuk lakton A adalah sebagai berikut:

Pada kadar 40  $\mu\text{g/ml}$  nilai persen kematian = 54,38% = (a)

Pada kadar 35  $\mu\text{g/ml}$  nilai persen kematian = 21,26% = (b)

Selisih nilai persen kematian kedua kadar tersebut = 33,12% = (c)

Selisih kedua nilai kadar = 5  $\mu\text{g/ml}$  (d)

Selisih nilai persen kematian yang mendekati harga 50% = 4,38% (e)

$$LC_{50} = 40 \mu\text{g/ml} - (4,38/33,12 \times 5 \mu\text{g/ml})$$

$$= 40 - 0,66 \mu\text{g/ml}$$

$$= 39,34 \mu\text{g/ml}$$

### 5.1.2 Hasil uji sitotoksisitas lakton B

Hasil pengamatan dengan menggunakan elisa reader terhadap sediaan-sediaan yang telah diinkubasi selama 24 jam tercantum pada Tabel V.3 di bawah ini.

Tabel V.3

Hasil pengamatan uji sitotoksisitas lakton B

Kadar (µg/ml)	Lakton B + Media + Sel (Sediaan C)				Lakton B + Media (Sediaan D)			
	I	II	III	Rerata	I	II	III	Rerata
60	0,553	0,573	0,557	0,561	0,491	0,488	0,516	0,498
55	0,576	0,574	0,607	0,568	0,485	0,486	0,514	0,495
50	0,585	0,584	0,591	0,587	0,484	0,484	0,515	0,494
45	0,578	0,591	0,594	0,588	0,477	0,474	0,505	0,485
40	0,547	0,551	0,534	0,554	0,481	0,474	0,500	0,485
35	0,683	0,682	0,679	0,681	0,481	0,479	0,509	0,490
30	0,859	0,845	0,848	0,651	0,481	0,474	0,505	0,487
25	0,920	0,914	0,893	0,909	0,486	0,482	0,508	0,492
20	1,020	1,013	1,007	1,013	0,480	0,482	0,503	0,488
	Media + Sel (Sediaan A)				Media saja (Sediaan B)			
	I	II	III	Rerata	I	II	III	Rerata
	1,050	1,018	1,032	1,033	0,509	0,496	0,530	0,512

Setelah dilakukan perhitungan persen kematian dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Kematian} = \frac{(A - B) - (C - D)}{(A - B)} \times 100 \%$$

maka didapat persen kematian untuk setiap konsentrasi seperti tercantum pada Tabel V.4.

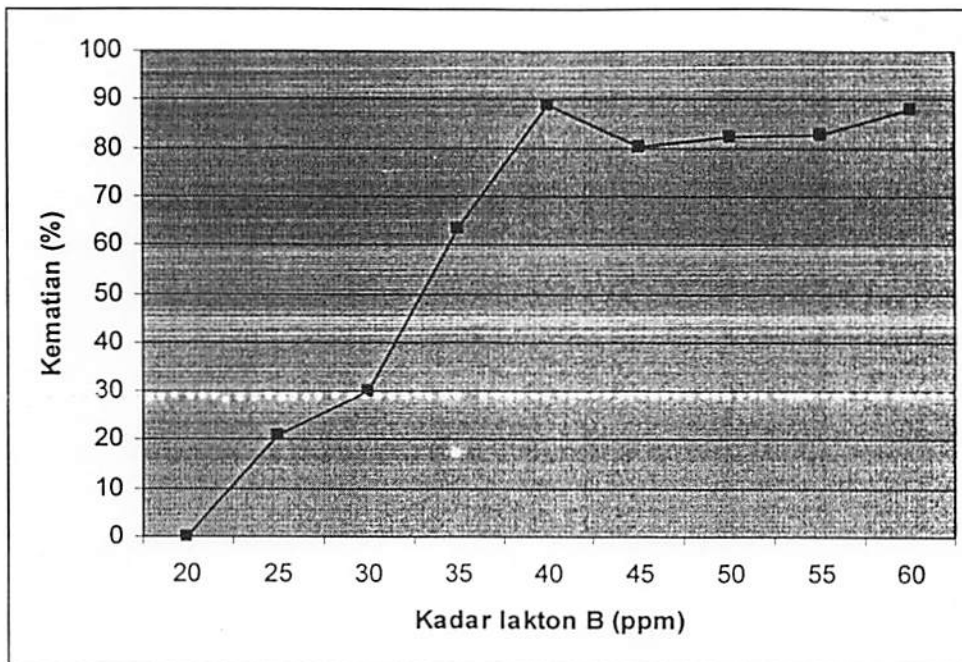
Tabel V.4

Persen kematian sel karena lakton B

Kadar (µg/ml)	Kematian (%)
60	87,99
55	82,62
50	82,30
45	80,38
40	88,69
35	63,26
30	30,22
25	21,06
20	-0,64

Bila data kematian sel karena lakton B tersebut disajikan dalam bentuk grafik maka akan tampak sebagai berikut (Gambar 5.2).





Gambar 5.2 Grafik persen kematian vs konsentrasi lakton B

Dari grafik di atas tampak bahwa untuk lakton B kadar yang menyebabkan kematian pada 50% sel ( $LC_{50}$ ) berada di antara 30 dan 35 ppm. Perhitungan  $LC_{50}$  untuk lakton B adalah sebagai berikut:

Perhitungan  $LC_{50}$  untuk lakton B adalah sebagai berikut:

Pada kadar 35  $\mu\text{g/ml}$  nilai persen kematian = 63,26% = (a)

Pada kadar 30  $\mu\text{g/ml}$  nilai persen kematian = 30,22% = (b)

Selisih nilai persen kematian kedua kadar tersebut = 33,04% = (c)

Selisih kedua nilai kadar = 5  $\mu\text{g/ml}$  (d)

Selisih nilai persen kematian yang mendekati harga 50% = 13,26% (e)

$$LC_{50} = 35 \mu\text{g/ml} - (13,26/33,04 \times 5 \mu\text{g/ml})$$

$$= 35 - 2,01 \mu\text{g/ml}$$

$$= 32,99 \mu\text{g/ml}$$

Bila dibandingkan dalam hal toksisitas terhadap sel mieloma, lakton B dengan  $LC_{50} = 33$  ppm sedikit lebih toksik daripada lakton A yang memiliki  $LC_{50} = 39$  ppm. Perbedaan antara kedua lakton adalah pada ada gugus metil yang terdapat pada lakton B tetapi tidak terdapat pada lakton A. Adanya gugus metil menyebabkan sifat lipofilnya lebih tinggi dibanding lakton A, sehingga lakton B dapat diprediksi lebih mudah

menembus membran sel. Adanya gugus metil juga menyebabkan struktur ruang lakton B lebih mirip dengan lasiodiplodin, sehingga interaksinya dengan reseptor lebih baik dibanding lakton A.

Mengacu kepada pedoman National Cancer Institute (Amerika Serikat), lakton A dan lakton B tidak memenuhi kriteria untuk dikembangkan sebagai anti kanker, karena memiliki LC<sub>50</sub> di atas 4 ppm.

### 5.1.3 Uji toksisitas DMSO

Hasil pengamatan pada uji toksisitas DMSO disajikan pada Tabel V.5 di bawah ini.

**Tabel V.5**  
**Hasil pengamatan uji sitotoksitas DMSO**

Kadar (µg/ml)	DMSO + Media + Sel (Sediaan C)			DMSO + Media (Sediaan D)		
	I	II	Rerata	I	II	Rerata
60	0,898	0,881	0,890	0,326	0,307	0,317
55	0,879	0,832	0,856	0,305	0,310	0,308
50	0,845	0,844	0,845	0,311	0,317	0,314
45	0,844	0,852	0,848	0,321	0,327	0,324
40	0,830	0,874	0,852	0,326	0,349	0,338
35	0,874	0,879	0,877	0,314	0,297	0,306
30	0,871	0,851	0,861	0,294	0,304	0,299
20	0,876	0,872	0,874	0,304	0,318	0,311
20	0,873	0,864	0,869	0,320	0,325	0,323
	Media + Sel (Sediaan A)			Media saja (Sediaan B)		
	I	II	Rerata	I	II	Rerata
	0,833	0,845	0,839	0,310	0,322	0,316

Setelah dilakukan perhitungan persen kematian dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Kematian} = \frac{(A - B) - (C - D)}{(A - B)} \times 100 \%$$

maka didapat persen kematian untuk setiap konsentrasi seperti tercantum pada Tabel V.6.

**Tabel V.6****Persen kematian sel karena DMSO**

Kadar ( $\mu\text{g/ml}$ )	Kematian (%)
60	- 9,39
55	- 4,61
50	- 1,27
45	- 0,03
40	- 1,78
35	- 9,00
30	- 7,28
25	- 7,48
20	- 4,23

Uji toksisitas DMSO dilakukan untuk melihat apakah DMSO yang digunakan sebagai pelarut juga dapat mengakibatkan kematian sel. Dari data kematian sel karena pengaruh DMSO (Tabel V.6) dapat dilihat bahwa pada semua kadar DMSO yang diujikan tidak terjadi kematian, sehingga dapat disimpulkan bahwa kematian sel pada uji toksisitas lakton A dan lakton B hanya disebabkan oleh kedua lakton tersebut.

## 5.2.4 Hasil uji doubling time

## 5.2.4.1 Doubling time terhadap lakton A

Hasil pengamatan doubling time terhadap lakton B disajikan pada Tabel V.7 sampai dengan Tabel V.9.

**Tabel V.7****Hasil pengamatan doubling time lakton A setelah 24 jam**

Kadar ( $\mu\text{g/ml}$ )	Lakton A + Media + Sel (Sediaan C)				Lakton A + Media (Sediaan D)			% Kematian
	I	II	III	Rerata	I	II	Rerata	
45	0,358	0,357	0,362	0,359	0,383	0,365	0,374	103,88
42,5	0,333	0,336	0,333	0,334	0,345	0,343	0,344	102,59
40	0,344	0,346	0,341	0,344	0,344	0,348	0,346	100,60
37,5	0,418	0,397	0,380	0,398	0,336	0,345	0,341	85,04
35	0,499	0,483	0,479	0,487	0,352	0,338	0,345	63,28
	Media + Sel (Sediaan A)				Media saja (Sediaan B)			
	I	II	III	Rerata	I	II	III	Rerata
	0,732	0,744	0,735	0,737	0,346	0,349	0,355	0,350

**Tabel V.8**

**Hasil pengamatan doubling time lakton A setelah 48 jam**

Kadar (µg/ml)	Lakton A + Media + Sel (Sediaan C)				Lakton A + Media (Sediaan D)			% Ke-matian
	I	II	III	Rerata	I	II	Rerata	
45	0,374	0,369	0,365	0,369	0,394	0,387	0,391	103,08
42,5	0,357	0,351	0,346	0,351	0,372	0,377	0,375	103,36
40	0,362	0,352	0,353	0,356	0,380	0,371	0,376	102,88
37,5	0,405	0,349	0,376	0,377	0,378	0,372	0,375	99,76
35	0,433	0,420	0,435	0,429	0,384	0,377	0,381	92,91
	Media + Sel (Sediaan A)				Media saja (Sediaan B)			
	I	II	III	Rerata	I	II	III	Rerata
	1,085	1,056	1,063	1,068	0,382	0,374	0,381	0,379

**Tabel V.9**

**Hasil pengamatan doubling time lakton A setelah 72 jam**

Kadar (µg/ml)	Lakton A + Media + Sel (Sediaan C)				Lakton A + Media (Sediaan D)			% Ke-matian
	I	II	III	Rerata	I	II	Rerata	
45	0,335	0,329	0,327	0,330	0,354	0,343	0,349	103,36
42,5	0,327	0,319	0,320	0,322	0,333	0,328	0,331	101,57
40	0,322	0,318	0,315	0,318	0,335	0,334	0,335	102,99
37,5	0,319	0,311	0,313	0,314	0,333	0,335	0,334	103,64
35	0,347	0,335	0,332	0,338	0,337	0,341	0,339	100,19
	Media + Sel (Sediaan A)				Media saja (Sediaan B)			
	I	II	III	Rerata	I	II	III	Rerata
	0,908	0,861	0,907	0,892	0,344	0,341	0,368	0,351

**5.2.4.2 Doubling time terhadap lakton B**

Hasil pengamatan doubling time terhadap lakton B disajikan pada Tabel V.10 sampai dengan Tabel V.12.

Tabel V.10

Hasil pengamatan doubling time lakton B setelah 24 jam

Kadar (µg/ml)	Lakton B + Media + Sel (Sediaan C)				Lakton B + Media (Sediaan D)			% Ke- matian
	I	II	III	Rerata	I	II	Rerata	
45	0,466	0,463	0,469	0,466	0,357	0,360	0,359	72,20
42,5	0,495	0,512	0,515	0,507	0,343	0,343	0,343	57,50
40	0,536	0,532	0,529	0,532	0,346	0,352	0,349	52,59
37,5	0,556	0,554	0,556	0,555	0,344	0,359	0,347	46,12
35	0,587	0,567	0,573	0,576	0,353	0,357	0,355	42,93
	Media + Sel (Sediaan A)				Media saja (Sediaan B)			
	I	II	III	Rerata	I	II	III	Rerata
	0,732	0,744	0,735	0,737	0,346	0,349	0,355	0,350

Tabel V.11

Hasil pengamatan doubling time lakton B setelah 48 jam

Kadar (µg/ml)	Lakton B + Media + Sel (Sediaan C)				Lakton B + Media (Sediaan D)			% Ke- matian
	I	II	III	Rerata	I	II	Rerata	
45	0,400	0,417	0,409	0,409	0,381	0,389	0,385	96,56
42,5	0,472	0,468	0,467	0,469	0,378	0,379	0,379	86,85
40	0,555	0,546	0,553	0,551	0,373	0,386	0,380	75,04
37,5	0,662	0,635	0,619	0,639	0,380	0,389	0,385	63,08
35	0,695	0,694	0,722	0,704	0,377	0,389	0,383	53,42
	Media + Sel (Sediaan A)				Media saja (Sediaan B)			
	I	II	III	Rerata	I	II	III	Rerata
	1,085	1,037	1,082	1,068	0,382	0,374	0,381	0,379

Tabel V.12

Hasil pengamatan doubling time lakton B setelah 72 jam

Kadar (µg/ml)	Lakton B + Media + Sel (Sediaan C)				Lakton B + Media (Sediaan D)			% Ke- matian
	I	II	III	Rerata	I	II	Rerata	
45	0,333	0,339	0,331	0,334	0,338	0,354	0,346	102,16
42,5	0,363	0,357	0,366	0,362	0,324	0,339	0,332	94,36
40	0,446	0,440	0,434	0,440	0,337	0,344	0,341	81,61
37,5	0,500	0,472	0,501	0,491	0,332	0,337	0,335	71,07
35	0,697	0,696	0,717	0,703	0,328	0,337	0,333	31,45
	Media + Sel (Sediaan A)				Media saja (Sediaan B)			
	I	II	III	Rerata	I	II	III	Rerata
	0,908	0,861	0,907	0,892	0,344	0,341	0,368	0,351

### 5.2.4.3 Doubling time terhadap DMSO

Hasil pengamatan doubling time terhadap DMSO disajikan pada Tabel V.13 sampai dengan Tabel V.15

**Tabel V.13**

**Hasil pengamatan doubling time DMSO setelah 24 jam**

Kadar (µg/ml)	DMSO + Media + Sel (Sediaan C)				DMSO + Media (Sediaan D)			% Kematian
	I	II	III	Rerata	I	II	Rerata	
45	0,813	0,797	0,797	0,802	0,378	0,369	0,374	- 8,38
42,5	0,844	0,779	0,759	0,794	0,367	0,369	0,368	- 7,67
	Media + Sel (Sediaan A)				Media saja (Sediaan B)			
	I	II	III	Rerata	I	II	III	Rerata
	0,755	0,770	0,752	0,759	0,356	0,362	0,371	0,363

**Tabel V.14**

**Hasil pengamatan doubling time DMSO setelah 48 jam**

Kadar (µg/ml)	DMSO + Media + Sel (Sediaan C)				DMSO + Media (Sediaan D)			% Kematian
	I	II	III	Rerata	I	II	Rerata	
45	1,082	1,178	1,106	1,122	0,394	0,387	0,391	- 2,15
42,5	1,172	1,186	1,164	1,174	0,409	0,403	0,406	- 7,25
	Media + Sel (Sediaan A)				Media saja (Sediaan B)			
	I	II	III	Rerata	I	II	III	Rerata
	1,20	1,129	1,043	1,124	0,410	0,406	0,408	0,408

**Tabel V.15**

**Hasil pengamatan doubling time DMSO setelah 72 jam**

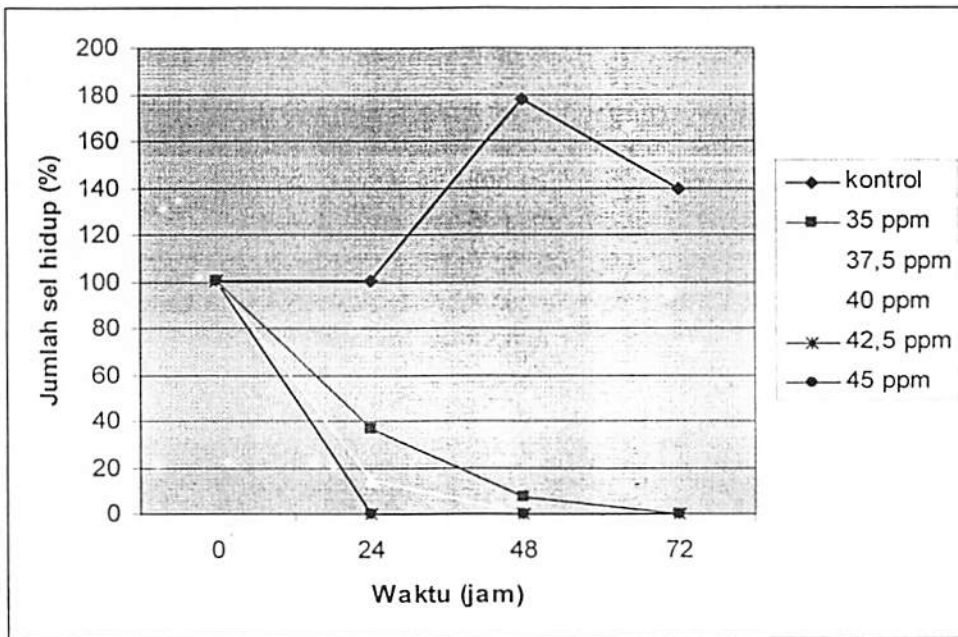
Kadar (µg/ml)	DMSO + Media + Sel (Sediaan C)				DMSO + Media (Sediaan D)			% Kematian
	I	II	III	Rerata	I	II	Rerata	
45	0,930	0,921	0,985	0,945	0,371	0,348	0,360	- 2,85
42,5	0,970	0,933	0,911	0,938	0,369	0,362	0,366	- 0,51
	Media + Sel (Sediaan A)				Media saja (Sediaan B)			
	I	II	III	Rerata	I	II	III	Rerata
	0,952	0,929	0,909	0,930	0,357	0,363	0,360	0,360

Berdasarkan data persen sel hidup dari Tabel V.7 sampai dengan Tabel V.9 dan Tabel V.13 sampai dengan Tabel V.15, maka hasil uji doubling time untuk lakton A adalah sebagai berikut (Tabel V. 16).

**Tabel V.16**  
**Hasil Uji Doubling Time Lakton A**

Kadar ( $\mu\text{g/ml}$ )	Sel Hidup (%)		
	24 jam	48 jam	72 jam
45	0	0	0
42,5	0	0	0
40	0	0	0
37,5	15	0,2	0
35	36,7	7,1	0
Kontrol sel	100	178,04	139,79

Bila data tersebut ditampilkan dalam bentuk grafik akan tampak seperti pada Gambar 5.3 di bawah ini.



Gambar 5.3 Hasil uji doubling time untuk lakton A

Dari hasil di atas dapat dilihat bahwa untuk lakton A, dari hari pertama, hari kedua hingga hari ketiga jumlah sel mieloma yang mati semakin banyak. Bila dibandingkan dengan kurva kontrol yang menunjukkan dari hari pertama ke hari kedua jumlah sel hidup meningkat, maka dapat disimpulkan bahwa penurunan jumlah sel hidup pada hari kedua disebabkan oleh lakton A. Sedangkan penurunan jumlah sel hidup pada hari ketiga tidak dapat disimpulkan sebagai akibat adanya lakton A karena pada kelompok kontrol juga terjadi penurunan jumlah sel hidup.

Berdasarkan data persen sel hidup dari Tabel V.10 sampai dengan Tabel V.15, maka hasil uji doubling time untuk lakton B adalah sebagai berikut (Tabel V. 17).

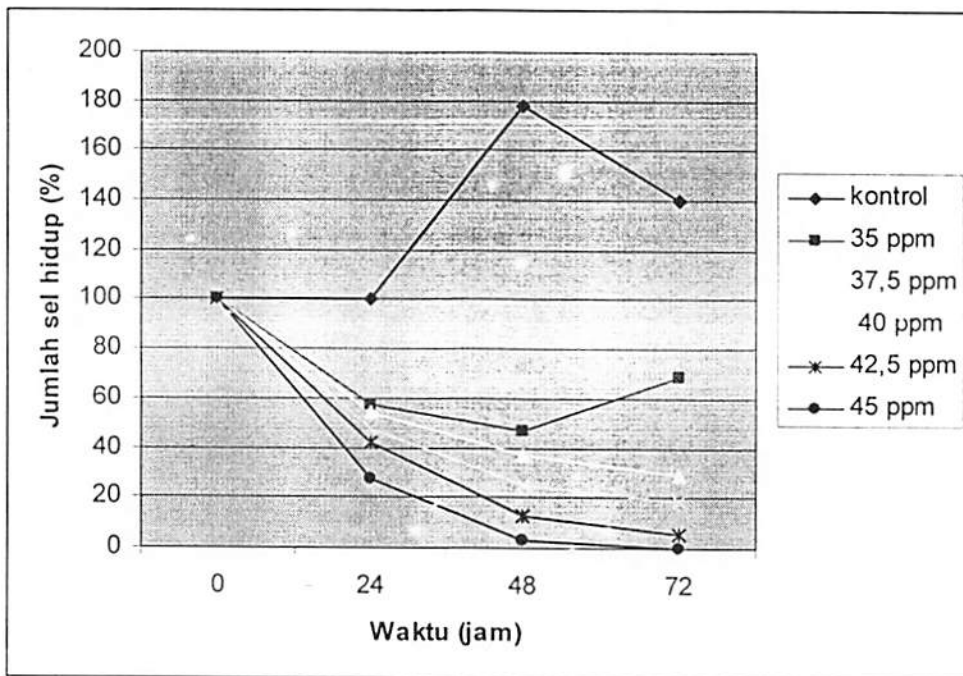


Tabel V.17

## Hasil Uji Doubling Time Lakton B

Kadar ( $\mu\text{g/ml}$ )	Sel Hidup (%)		
	24 jam	48 jam	72 jam
45	27,8	3,4	0
42,5	42,5	13,1	5,6
40	47,5	25	18,8
37,5	53,9	36,9	28,9
35	57,1	46,6	68,5
Kontrol sel	100	178,04	139,79

Bila data tersebut ditampilkan dalam bentuk grafik akan tampak seperti pada Gambar 5.4 di bawah ini.



Gambar 5.4 Hasil uji doubling time untuk lakton B

Dari hasil di atas dapat dilihat bahwa pada pengujian lakton B, dari hari pertama, hari kedua hingga hari ketiga jumlah sel mieloma yang hidup semakin sedikit, kecuali pada kadar 35 ppm yang menunjukkan peningkatan jumlah sel hidup pada hari ketiga. Tidak diketahui penyebab anomali dari kadar 25 ppm tersebut. Bila dibandingkan dengan kurva kontrol yang menunjukkan peningkatan jumlah sel hidup pada hari kedua, maka dapat disimpulkan bahwa penurunan jumlah sel hidup pada hari kedua disebabkan oleh lakton A. Sedangkan penurunan jumlah sel hidup pada hari ketiga tidak dapat

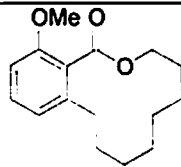
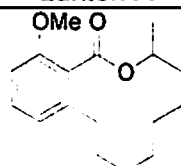


disimpulkan sebagai akibat adanya lakton B karena pada kelompok kontrol juga terjadi penurunan jumlah sel hidup.

## 5.2 Sitotoksitas terhadap sel P388

Hasil uji aktivitas lakton A dan lakton B terhadap sel P388 yang dinyatakan dalam  $LC_{50}$  disajikan pada Tabel V.18 di bawah ini.

**Tabel V.18**  
**Toksistas senyawa uji terhadap sel P388**

Sampel	$LC_{50}$ (ppm)
 Lakton A	14,25
 Lakton B	14,50

Dari data di atas terlihat bahwa  $LC_{50}$  kedua senyawa uji terhadap sel P388 hampir sama, yaitu 14,25 ppm untuk lakton A dan 14,50 ppm untuk lakton B. Berdasarkan kriteria National Cancer Institute, karena harga  $LC_{50}$  kedua senyawa lebih besar daripada 4 ppm, maka kedua senyawa tersebut tidak dapat dikatakan memiliki aktivitas antikanker terhadap sel P388.

## **BAB VI**

### **KESIMPULAN**

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan diambil beberapa kesimpulan sebagai berikut:

1. Nilai  $LC_{50}$  dehidroksidemetillasiodiplodin (lakton A) dan demetillasiodiplodin (lakton B) terhadap sel mieloma mencit berturut-turut ialah 39,34 dan 32,99 mg/L.
2. Nilai  $LC_{50}$  dehidroksidemetillasiodiplodin (lakton A) dan demetillasiodiplodin (lakton B) terhadap sel P388 berturut-turut ialah 14,25 dan 14,50 mg/L.
3. Dehidroksidemetillasiodiplodin (lakton A) dan demetillasiodiplodin (lakton B) tidak bersifat anti leukemia terhadap sel P388.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bank Indonesia (2003). **Data Ekspor Nasional per Negara Tujuan** (<http://bi.go.id/> diakses pada tanggal 1 Desember 2003).
- Bhattacharjee A, OR Seguil dan JK De Brabander (2001). Total Synthesis and Biological Evaluation of Apicularen A and Synthetic Analogs. *Tetrahedron Lett.* 2001, 42, 1217-1220.
- Dalimartha S (1999). **Ramuan Tradisional Untuk Pengobatan Kanker**. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Lee K-H, N Hayashi, M Okano, IH Hall, R-Y Wu, AT McPhail (1982). Lasiodiplodin, A Potent Antileukemic Macrolide from *Euphorbia splendens*. *Phytochemistry* 1982, 21, 1119-1122
- Lewis A, I Stefanuti, SA Swain, SA Smith dan RJK Taylor (2003). A Formal Total Synthesis of (+)-Apicularen A: Base-Induced Conversion of Apicularen Derived Intermediates into Salicylhalamide-Like Products. *Organic & Biomolecular Chemistry* 2003, 1, 104-226.
- Mark's Fruit Crops Homepage (2005), (<http://www.uga.edu/fruit/cashew.html>, diakses pada tanggal 20 November 2005).
- McLaughlin JL, LL Rogers, JE Anderson (1998). The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals. *Drug Information Journal*, 1998, 32, 513-524.
- Rudyanto M, J Ekowati, Suzana (2006a). **Synthesis and Anticancer Prescreening of Lasiodiplodin Derivatives Derived from Natural Anacardic Acid**. ITSF Seminar on Science and Technology, Jakarta, February 2006.
- Rudyanto M, J Ekowati, Suzana, (2006b). **Utilisation of Anacardic Acids Isolated From Cashew Nut Shell as Starting Material for the Synthesis of Bioactive Materials: Synthesis and Toxicological Evaluation of Lasiodiplodin Derivatives**. Research report.
- Rudyanto M, J Ekowati, H Poerwono (2004). **Synthesis of Amides from Natural Anacardic Acids**. ITSF Seminar on Science and Technology, Jakarta, February 2004.
- Santos ML dan GC de Magelhaes (1999). Utilisation of Cashew Nut Shell Liquid from *Anacardium occidentale* as Starting Material for Organic Synthesis: A Novel Route to Lasiodiplodin from Cardols. *J. Braz. Chem. Soc.* 1999, 10, 13-20

- Siswandono dan B Soekardjo (2000). *Kimia Medisinal*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Sutrisno (2000). **Aktivitas Pakirizin dan Turunannya terhadap Pertumbuhan Sel Leukemia L1210**. Disertasi. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Turner WB, DC Aldridge, S Galt, D Giles (1971). Metabolites of *Lasioiplodia theobromae*. *Journal of the Chemical Society, Section C: Organic* 1971, 9, 1623-1627.
- Tyman JHP (1980). Cultivation, Processing and Utilisation of the Cashew. *Chem. Ind.* 1980, 54-62.
- Wikipedia (2008). Leukemia. [Http://en.wikipedia.org/wiki/leukemia](http://en.wikipedia.org/wiki/leukemia). Diakses pada tanggal 22 Desember 2008.
- World Health Organization (2003). **Global Cancer Rates Could Increase by 50% to 15 million by 2020**. [Http://www.who.int/mediacentre/news/release/2003/pr27/en/print.html](http://www.who.int/mediacentre/news/release/2003/pr27/en/print.html). Diakses pada tanggal 28 Februari 2006.
- Wu Y, X Liao, R Wang, X Xie dan JK De Brabander (2002). Total Synthesis and Initial Structure-Function Analysis of the Potent V-ATPase Inhibitors Salicylhalamide A and Related Compounds. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 3245-3253.
- Wu Y, OR Seguil dan JK De Brabander (2000). Synthesis and Initial Structure-Activity Relationship of Modified Salicylhalamides. *Organic Letters* 2000, 2, 4241-4244.

