

LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN TIM PASCASARJANA PERGURUAN TINGGI
(PTP)



SENYAWA BARU HIBRID ALKALOID ADDUCT DIELS-ALDER DAN
SIKLOADISI DARI *Melicope quercifolia* SEBAGAI LEAD COMPOUND
ANTIKANKER

TAHUN KE - 1 DARI RENCANA 2 TAHUN

Dr. MULYADI TANJUNG, MS. (00-2204-6503)
TJITJIK SRIE TJAHJANDARIE, Ph.D (00-0602-6502)

DIBLAYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122 SP211/PTNBH/DRPM/2018

UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018

LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN TIM PASCASARJANA PERGURUAN TINGGI
(PTP)

KKC
KK
480/19
Tan
S



SENYAWA BARU HIBRID ALKALOID ADDUCT DIELS-ALDER DAN
SIKLOADISI DARI *Melicope quercifolia* SEBAGAI LEAD COMPOUND
ANTIKANKER

TAHUN KE - 1 DARI RENCANA 2 TAHUN

Dr. MULYADI TANJUNG, MS. (00-2204-6503)
TJITJIK SRIE TJAHPANDARIE, Ph.D (00-0602-6502)

DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018

UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018

Judul : Senyawa Baru Hibrid Alkaloid Adduct Diels-Alder dan Sikloadisi Dari *Melicope quercifolia* Sebagai Lead Compound Antikanker

Peneliti/Pelaksana
Nama Lengkap : Dr. Drs Mulyadi Tanjung, M.S
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
NIDN : 0022046503
Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
Program Studi : Kimia
Nomor HP : 081357238863
Alamat surel (e-mail) : mulyadi-t@fst.unair.ac.id

Anggota (1)
Nama Lengkap : Dra Tjitjik Srie Tjahjandarie Ph.D
NIDN : 0006026502
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Institusi Mitra (jika ada)
Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 122,500,000
Biaya Keseluruhan : Rp 175,000,000

Mengetahui,
Dekan



(Prof. Win Darmanto, M.Si, Ph.D)
NIP/NIK 196106161987011001

Kota Surabaya, 13 - 11 - 2018
Ketua,

(Dr. Drs Mulyadi Tanjung, M.S)
NIP/NIK 196504221991021001

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi



(Prof. H. Hery Purnobasuki, Drs, M.Si, Ph.D)
NIP/NIK 196705071991021001

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

RINGKASAN

Kanker merupakan salah satu penyakit penyebab kematian kedua setelah jantung. Di Indonesia jumlah penderita penyakit ini tiap tahun meningkat. Kebutuhan obat kanker seperti taksol dan vinkristin otomatis mengalami peningkatan yang signifikan. Oleh karena itu, perlu eksplorasi senyawa antikanker baru yang poten, aman, efektif dan selektif sebagai kandidat obat dari tumbuhan, khususnya tumbuhan endemik Indonesia.

Melicope merupakan genus tumbuhan Rutaceae dan banyak ditemukan endemik di Indonesia. Senyawa **alkaloid baru** jenis kuinolin terisoprenilasi yakni 3-isoprenil-7-oksiisoprenil-4-metoksi quinolon telah berhasil dipisahkan dari daun *Melicope moluccana* (Tanjung, 2017). Dua **senyawa baru** alkaloid hibrid tipe adduct Diels-Alder dan sikloadisi yakni **melikodine K** dan **L** dari daun *Melicope denhamii* juga berhasil diisolasi dan sedang diuji aktivitas antikanker terhadap sel murin leukemia P-388, sel kanker payudara MCF7, dan sel kanker rahim HeLa. Hasil riset ini akan dipublikasikan pada jurnal bereputasi. Hasil pengukuran 1D dan 2D NMR dari tiga senyawa alkaloid hibrid baru tipe adduct Diels-Alder dan sikloadisi juga ditemukan pada daun *Melicope quercifolia*. Senyawa alkaloid hibrid tipe adduct Diels-Alder dan sikloadisi dari daun *Melicope* sampai saat ini belum ditemukan pada famili tumbuhan lain.

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas antikanker senyawa alkaloid hibrid dari daun *Melicope quercifolia*. Uji aktivitas antikanker senyawa alkaloid hibrid baru dari daun *M. quercifolia* diuji terhadap sel murin leukemia P-388, sel kanker payudara MCF7, dan sel kanker rahim HeLa menggunakan metode *MTT assay*. Selanjutnya evaluasi aktivitas antikanker ditinjau berdasarkan konsentrasi daya hambat IC_{50} , jenis senyawa dan gugus kromofor aktif dari senyawa alkaloid hibrid baru akan diperoleh *lead compound* antikanker.

Hasil penelitian ini diharapkan akan diperoleh suatu kajian komprehensif ilmu kimia tentang **road map hubungan struktur-aktivitas** antikanker tentang tumbuhan endemik Indonesia (*M. quercifolia*). Hasil penelitian diharapkan menghasilkan *lead compound* untuk dijadikan sebagai kandidat obat kanker baru dan menghasilkan publikasi di jurnal bereputasi

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

PRAKATA

Penelitian “Senyawa Baru Hibrid Alkaloid Adduct Diels-Alder dan Sikloadisi Dari *Melicope quercifolia* Sebagai Lead Compound Antikanker” telah dilakukan penyelesaian tahap akhir dalam analisis senyawa hasil isolasi tumbuhan *Melicope moluccana* T.G. Hartley untuk Tahun-I dari rencana 2 Tahun.

Penelitian ini dapat terlaksana dengan lancar atas bantuan dan kerjasama berbagai pihak, terutama dalam hal analisis spektroskopi. Ucapan terima kasih disampaikan kepada Prof. Dr. Yana Maolana Syah dari departemen kimia, Institut Teknologi Bandung, ITB yang telah membantu dalam pengukuran HRESI-MS Serta pihak *Tropical Disease Center* (TDC) Universitas Airlangga dalam analisis NMR dan saya ucapkan terima kasih kepada Kebun Raya Bogor, Bogor, Jawa Barat yang telah mengidentifikasi spesies tanaman ini.

DAFTAR ISI

	Halaman
1. Halaman Sampul	i
2. Halaman Pengesahan	ii
3. Ringkasan	iii
4. Prakata	iv
5. Daftar isi	v
6. Daftar Tabel	vi
7. Daftar gambar	vii
7. Daftar Lampiran	viii
8. BAB I. PENDAHULUAN	1
9. BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	3
10. BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	9
11. BAB IV. METODE PENELITIAN	10
12. BAB V. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	14
13. BAB VI. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	17
14. BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN	18
DAFTAR PUSTAKA	19
LAMPIRAN	
1. Artikel Ilmiah	20

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

DAFTAR TABEL

Nomor	Judul	Halaman
5.1	Hasil antikanker P-388 senyawa hasil isolasi <i>M. quercifolia</i>	14

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Judul	Halaman
2.1	Senyawa alkaloid tumbuhan <i>Melicope moluccana</i>	4
2.2	Senyawa hibrid tumbuhan <i>Melicope denhamii</i>	5
2.3	Senyawa <i>adduct</i> Diels-Alder antara asil floro glusinol dengan alkaloid	5
2.4	Senyawa <i>adduct hibrid</i> sikloadisi antara asam sinamat dengan alkaloid.....	5
2.5	Road map penelitian	7
4.1	Diagram alir penelitian.	13

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Judul	Halaman
1	Jurnal Publikasi <i>Natural Product Science</i>	20

BAB I PENDAHULUAN



1.1. Latar Belakang Permasalahan

Melicope merupakan genus tumbuhan yang banyak ditemukan endemik di Indonesia. Berdasarkan hasil penelitian dari Kelompok Penelitian Kimia Organik Bahan Alam, FST, Unair dalam kurun tiga tahun terakhir ini telah berhasil mengisolasi **senyawa baru** yakni 3-isoprenil-7-oksiisoprenil-4-metoksi quinolon dari daun *Melicope moluccana* yang poten sel murin leukemia P-388 (Tanjung, 2017). Di samping itu juga, dua **senyawa baru** alkaloid hibrid tipe adduct Diels-Alder dan sikloadisi yakni **melikodine K** dan **L** juga ditemukan pada daun *Melicope denhamii*. Senyawa hibrid alkaloid adduct Diels-Alder hanya ditemukan pada *Melicope*. Sampai saat ini belum ditemukan senyawa hibrid alkaloid pada famili tumbuhan lainnya. Penemuan senyawa hibrid tipe adduct Diels-Alder sebelumnya ditemukan pada tumbuhan *Morus*. Senyawa hibrid adduct Diels-Alder *Morus* berasal dari sesama senyawa flavonoid. Senyawa alkaloid hibrid adduct Diels-Alder dan sikloadisi *Melicope* merupakan penggabungan senyawa alkaloid-kumarin, alkaloid-asam sinamat, alkaloid-asil floro glusinol atau sesama alkaloid (Nakashima, *et al.*, 2011; 2012, Goerge, *et al.*, 2017).

Dengan ditemukannya senyawa hibrid baru adduct Diels-Alder dan sikloadisi *Melicope* memberi terobosan baru tentang keragaman senyawa *Melicope* baik ditinjau dari segi biosintesis, bioaktivitas, kemotaksonomi dan kegunaannya. Di samping itu, keragaman senyawa *Melicope* juga akan memberi dampak yang signifikan terhadap aspek ilmiah, aspek pendidikan dan aspek praktis.

Berdasarkan keterangan di atas, penelitian ini bertujuan untuk menentukan aktivitas antikanker alkaloid hibrid baru adduct Diels-Alder dan sikloadisi dari daun *Melicope quercifolia* terhadap berbagai sel kanker murin leukemia P-388, sel kanker payudara MCF7, dan sel kanker rahim HeLa menggunakan metode MTT. Senyawa alkaloid hibrid baru adduct Diels-Alder dan sikloadisi dijadikan target sebagai senyawa induk (*lead compound*) antikanker dan diharapkan menjadi kandidat obat kanker baru.

Metode yang digunakan untuk mengisolasi senyawa meliputi ekstraksi, fraksinasi dan pemurnian menggunakan kromatografi seperti kromatografi radial dan HPLC semipreparatif. Penentuan struktur molekul ditetapkan berdasarkan metode spektroskopi, meliputi spektroskopi ultraviolet, inframerah, resonansi magnetik inti 1D dan 2D NMR dan HMBC) serta spektroskopi massa resolusi tinggi (HRESIMS). Selanjutnya, senyawa alkaloid hibrid

ditentukan sifat sitotoksiknya terhadap sel murin leukemia P-388, sel kanker payudara MCF7, dan sel kanker rahim HeLa dengan metode MTT (Tanjung, 2017; 2016; 2013; 2012).

Berdasarkan latar belakang di atas, maka diharapkan senyawa alkaloid hibrid adduct Diels-Alder dan sikloadisi dari *Melicope quercifolia* dapat dijadikan sebagai *lead compound* dan kandidat obat kanker baru.

BAB II

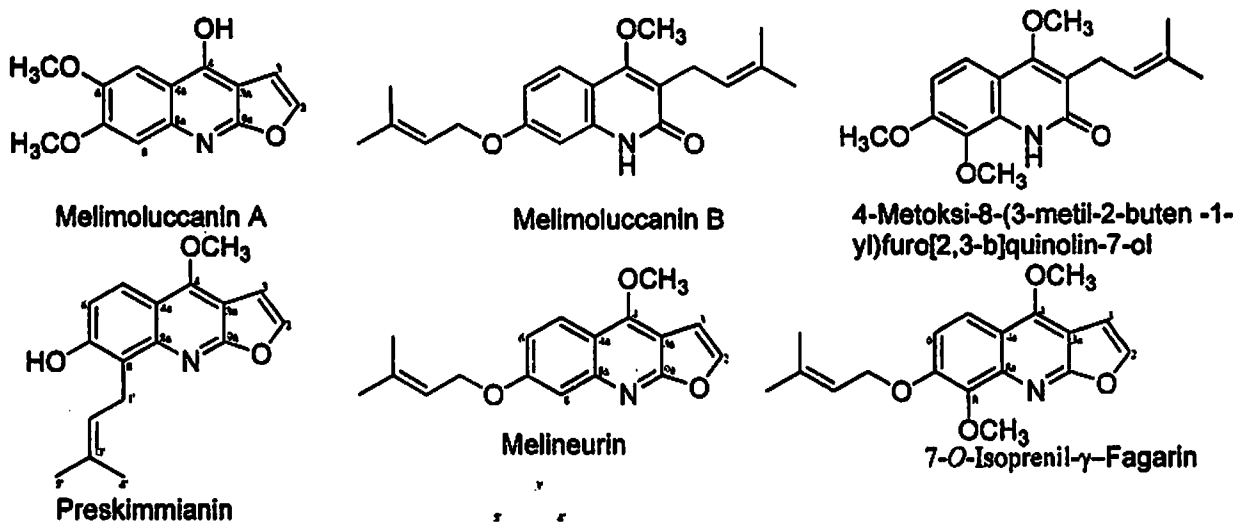
TINJAUAN PUSTAKA

Kanker merupakan penyakit yang disebabkan oleh adanya pertumbuhan sel dalam tubuh yang abnormal. Sel tersebut membelah secara terus-menerus dan menyerang jaringan tubuh lain. Sel kanker dapat menyebar ke bagian tubuh lainnya melalui darah dan dapat menyebabkan kematian. Taksol dan vinkristin merupakan obat yang umum digunakan bagi penderita kanker. Mengingat kebutuhan penderita kanker sangat tinggi terhadap kedua obat tersebut dan produksi obat tidak mencukupi dengan jumlah penderita, maka perlu eksplorasi senyawa antikanker baru yang poten, aman, efektif dan selektif sebagai, khususnya tumbuhan endemik Indonesia.

Melicope merupakan salah satu genus terbesar dari famili Rutaceae yang terdiri dari 235 spesies. Di Indonesia, rebusan daun *Melicope* dimanfaatkan masyarakat sebagai pengobatan diare, demam, dan kanker (Heyne, 1987). Pemanfaatan dari rebusan tersebut tentunya berkaitan dengan senyawa aktif atau senyawa metabolit sekunder dalam ekstrak tumbuhan.

Hasil penelitian dari kelompok bahan alam Departemen Kimia, Universitas Airlangga telah mengisolasi enam senyawa alkaloid kuinolin dari daun *M. moluccana* T.G. Hartley. Dari enam senyawa alkaloid kuinolin tersebut, dua merupakan *new compounds* yakni **melimoluccanin A**, dan **B** serta empat senyawa yang sudah dikenal yakni preskimmianin, melineurin, 4-metoksi-8-(3-metil-2-buten-1-yl)furo[2,3-b]quinolin-7-ol dan 7-*O*-isoprenil- γ -fagarin seperti terlihat pada Gambar 2.1. Senyawa **moluccanin B** (3-isoprenil-7-oksiisoprenil-4-metoksi quinolon) memperlihatkan sitotoksik yang kuat terhadap viabilitas sel murin leukemia P-388 dan *Plasmodium falciparum* strain 3D7 dengan nilai IC_{50} = 0,18 dan 0,26 μ g/mL (Tanjung, 2017).

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

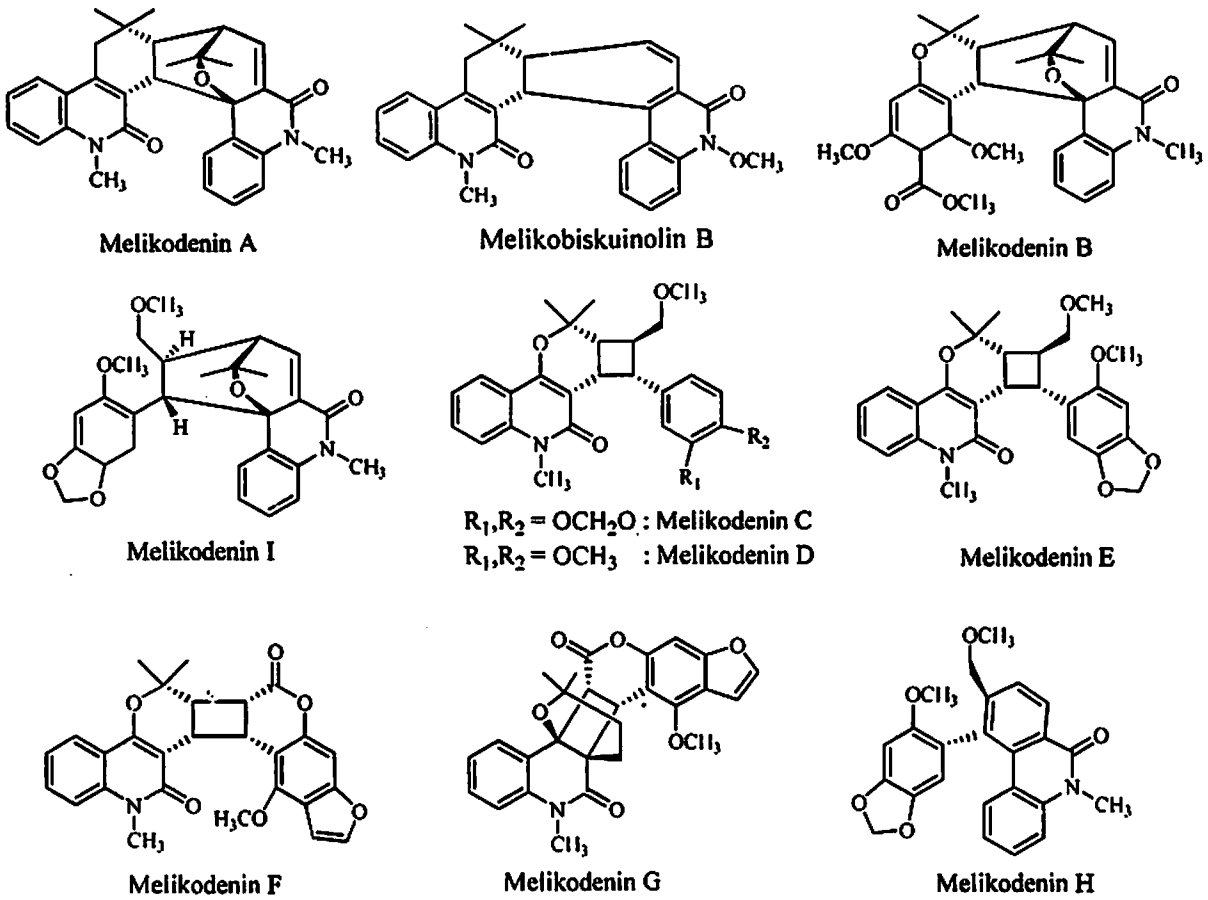


Gambar 2.1. Senyawa alkaloid tumbuhan *Melicope moluccana*

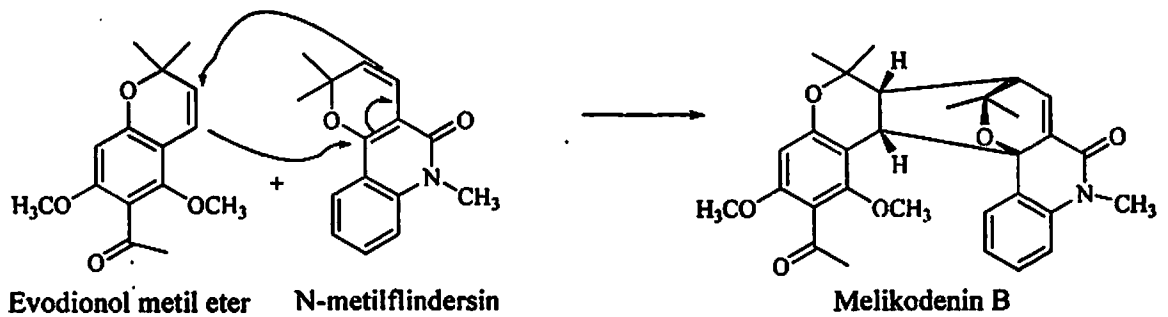
M. denhamii merupakan satu-satunya tumbuhan *Melicope* Indonesia yang telah dilaporkan kandungan senyawa alkaloid kuinolin. Keunikan senyawa alkaloid kuinolin *M. denhamii* menghasilkan senyawa *hibrid* melalui reaksi *adduct* Diels-Alder dan reaksi siklo adisi. Senyawa *hibrid* *M.denhamii* sampai saat ini belum ditemukan pada spesies *Melicope* dari negara lain. Pembentukan senyawa *hibrid* merupakan penggabungan senyawa alkaloid-kumarin, alkaloid-asam sinamat, alkaloid-asil floro glusinol atau sesama alkaloid (Nakashima, *et al.*, 2011; 2012, Goerge, *et al.*, 2017). Struktur senyawa *hibrid* dari daun *M. denhamii* dapat dilihat pada Gambar 2.2.

Senyawa *hibrid adduct* Diels-Alder merupakan reaksi antara diena dengan alkena. Senyawa melikodenin B merupakan *adduct* Diels-Alder antara senyawa N-metil flindersin (alkaloid) dengan evodionol metil eter (asil floro glusinol). Pembentukan melikodenin B, evodionol metil eter merupakan alkena sedangkan N-metil flindersin merupakan dienofil seperti terlihat pada Gambar 2.3.

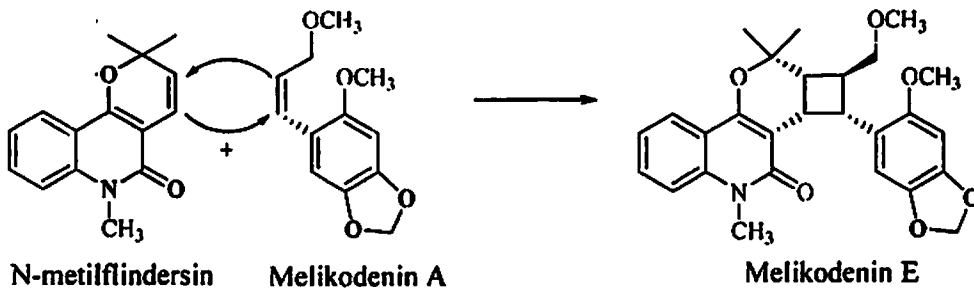
Senyawa melikodenin E merupakan senyawa *hibrid* dari hasil reaksi sikloadisi [2+2] menghasilkan cincin siklobutana. Pembentukan senyawa melikodenin E merupakan reaksi sikloadisi antara senyawa N-metil flindersin (alkaloid) dengan melikodin A (asam sinamat) dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.2. Senyawa hibrid tumbuhan *Melicope denhamii*



Gambar 2.3. Senyawa *adduct* Diels-Alder antara asil floro glusinol dengan alkaloid

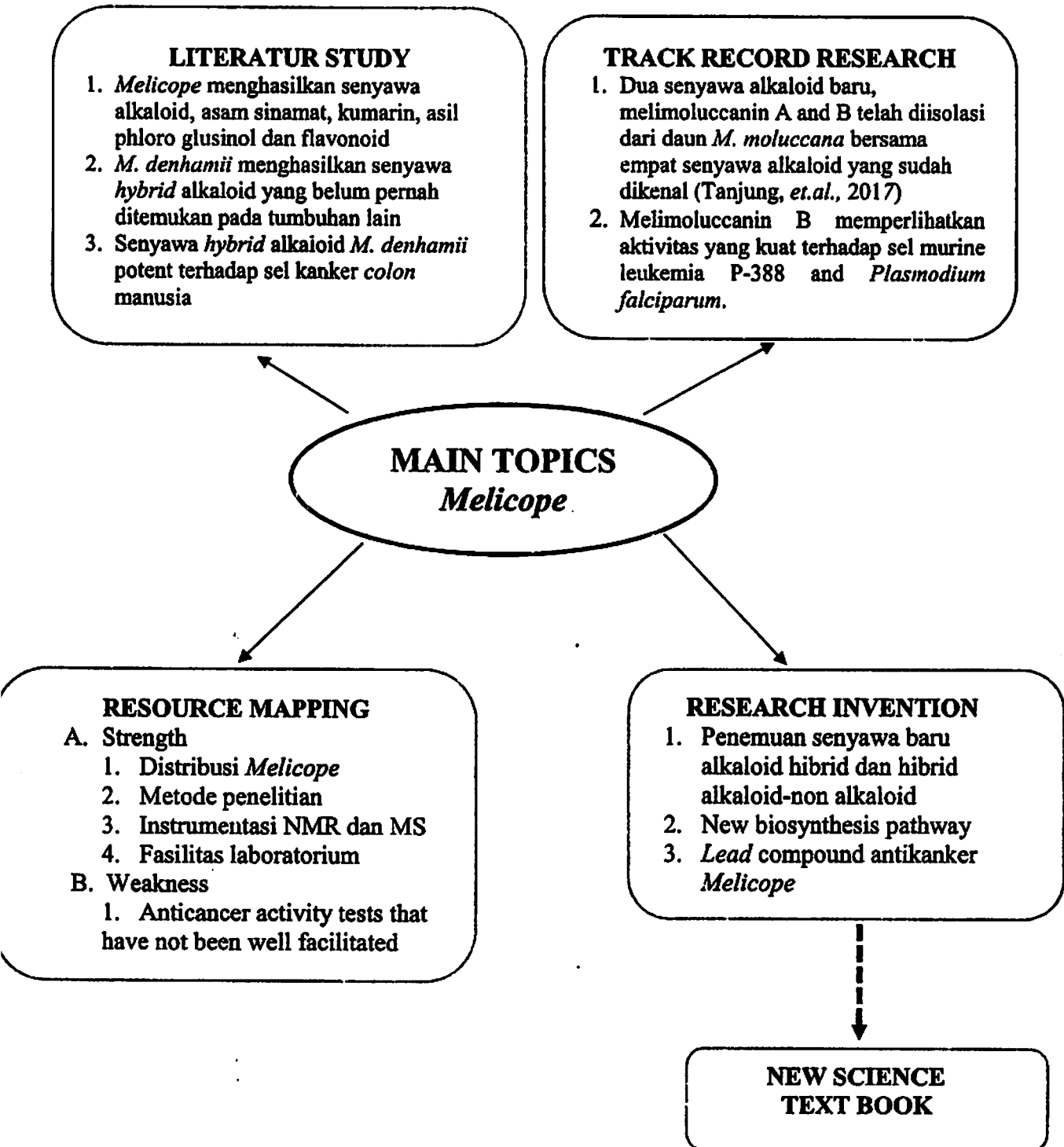


Gambar 2.4. Senyawa *adduct hibrid* sikloadisi antara asam sinamat dengan alkaloid

Tumbuhan *Melicope* di Indonesia terdapat sekitar 60 spesies dan tersebar di seluruh Kepulauan Nusantara. Berdasarkan studi literatur, *Melicope* menghasilkan senyawa hibrid *adduct* Diels-Alder dan sikloadisi yang tidak ditemukan pada famili tumbuhan lain. Senyawa hibrid *Melicope adduct* Diels-Alder dan sikloadisi terdiri penggabungan senyawa alkaloid-non alkaloid dan non alkaloid- non alkaloid yang memerlukan metode khusus untuk ekstraksi memisahkan kedua jenis senyawa hibrid. Berdasarkan uji pendahuluan terhadap daun *M. quercitifolia* memperlihatkan beberapa spot senyawa yang signifikan untuk diangkat sebagai bahan tumbuhan dalam penelitian ini. Spesies *M. quercitifolia* sampai saat ini belum ada laporan data fitokimianya. Ekstraksi dan isolasi senyawa hibrid *Melicope* menggunakan pelarut metanol pada suhu kamar. Pemisahan dan pemurnian senyawa hibrid alkaloid-non alkaloid dan non alkaloid- non alkaloid menggunakan fasa diam berupa silika gel, sphadeks LH-20 atau poliamida. Identifikasi dan penentuan struktur kimia senyawa hibrid *Melicope* ditentukan dengan menggunakan spektroskopi UV, FTIR, MS, 1D dan 2D NMR. Penekanan dalam penentuan struktur senyawa baru hibrid *Melicope* lebih banyak difokuskan khususnya pengukuran spektrum ^1H dan ^{13}C NMR, HMQC, HMBC, COSY dan NOESY. Senyawa baru hibrid *Melicope* yang sudah diketahui strukturnya menggunakan alat resolusi tinggi untuk menentukan massa molekul dan rumus molekul senyawa tersebut. Senyawa hibrid yang memiliki atom karbon kiral khususnya alkohol, maka konfigurasi absolutnya ditetapkan menggunakan pereaksi Mosher. Senyawa hibrid hasil isolasi dari keempat spesies *Melicope* akan ditentukan aktivitas antikanker terhadap sel kanker murin leukimia P-388, sel kanker payudara MCF7 dan sel kanker rahim HeLa untuk memperoleh data hubungan struktur-aktivitas antikanker serta *lead compound* antikanker.

Hasil penelitian ini diharapkan memperoleh senyawa baru dalam bentuk hibrid *adduct* Diels-Alder dan sikloadisi baik senyawa alkaloid-non alkaloid maupun non alkaloid- non alkaloid. Struktur senyawa hibrid baru *adduct* Diels-Alder dan sikloadisi *Melicope* akan diketahui senyawa alkaloid, asam sinamat, kumarin atau asil floro glusinol yang menjadi prekursor. Senyawa *adduct* Diels-Alder dan sikloadisi *Melicope* menghasilkan gambaran pembentukan jalur biosintesis baru senyawa hibrid. Di samping itu, uji aktivitas antikanker senyawa hibrid *Melicope* terhadap sel kanker murin leukimia P-388, sel kanker payudara MCF7 dan sel kanker rahim HeLa akan memperoleh *lead compound* antikanker. Parameter hubungan struktur-aktivitas antikanker senyawa hibrid *Melicope* akan ditinjau berdasarkan gugus fungsi, jenis senyawa, kepolaran dan ukuran senyawa hibrid. Hasil penelitian ini diharapkan memperoleh penemuan baru khususnya keragaman senyawa hibrid *Melicope* dan menjadi rujukan dalam artikel ilmiah tentang ilmu kimia *Melicope*.

Adapun *road map* penelitian tentang Pemetaan Potensi dan Senyawa Aktif Tumbuhan *Melicope* Indonesia Dalam Rangka Produksi Senyawa Antikanker Baru ini adalah sebagai berikut,



Gambar 2.5. Road map penelitian

Berdasarkan pemahaman di atas, diharapkan hasil riset ini berguna untuk menggali potensi tumbuhan endemik Indonesia yang dapat dikembangkan sebagai kandidat obat kanker baru.

Aspek Pendidikan: penelitian ini memberikan informasi keragaman senyawa metabolit sekunder *Melicope* khususnya senyawa *hibrid* dari *adduct* Diels-Alder dan sikloadisi. Proses pembentukan senyawa *hibrid* diharapkan memberi gambaran tentang jalur biosintesis baru senyawa metabolit sekunder *Melicope*. Dengan ditemukannya senyawa *hibrid* baru diharapkan penelitian ini memberikan *new science* dan *text book* tentang keseragaman senyawa *hibrid Melicope*.

Aspek Ilmiah: penelitian ini memberikan informasi tentang model pembuktian ilmiah senyawa *hibrid Melicope* melalui reaksi *adduct* Diels-Alder dan sikloadisi dan peluang menemukan senyawa baru, kerangka baru serta mengungkapkan pola hubungan struktur-aktivitas antikanker sehingga menghasilkan *lead compound* senyawa *hibrid Melicope*. Senyawa baru yang dihasilkan tumbuhan *Melicope* Indonesia diharapkan dapat memberi kontribusi ilmiah sehingga dapat dipublikasikan pada jurnal internasional yang bereputasi.

Aspek Praktis: *lead compound* senyawa *hibrid* atau senyawa alkaloid, flavonoid, kumarin, asil floro glusinol dan asam sinamat *Melicope* diharapkan dapat diaplikasikan sebagai alternatif obat kanker baru.

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian:

Berdasarkan latar belakang di atas, maka tujuan penelitian yang diusulkan meliputi:

1. Menentukan struktur senyawa alkaloid hibrid adduct Diels-Alder dan sikloadisi dari *Melicope quercifolia*.
2. Menentukan aktivitas antikanker senyawa alkaloid hibrid adduct Diels-Alder dan sikloadisi dari *Melicope quercifolia* terhadap sel murin leukemia P-388, sel kanker payudara MCF7, dan sel kanker rahim HeLa sehingga diperoleh *lead compound* antikanker.

3.2 Manfaat Penelitian

Sebagaimana yang telah dikemukakan pada latar belakang permasalahan di atas, penelitian yang diajukan ini adalah dalam rangka mengeksplorasi keragaman senyawa alkaloid hibrid adduct Diels-Alder dan sikloadisi dari *Melicope quercifolia*, khususnya memperoleh *lead compound* sebagai kandidat obat kanker.

3.3 Keutamaan Penelitian

Penelitian ini difokuskan mengkaji lebih dalam tentang keragaman alkaloid hibrid adduct Diels-Alder dan sikloadisi dari *Melicope quercifolia* serta menguji aktivitas antikanker terhadap sel murin leukemia P-388, sel kanker payudara MCF7, dan sel kanker rahim HeLa sehingga memperoleh gambaran hubungan struktur-aktivitas antikanker untuk memperoleh *lead compound* antikanker. Selanjutnya hasil penelitian inidiharapkan dapat dipublikasikan di jurnal-jurnal internasional yang bereputasi.



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Metode Penelitian

Pencapaian tujuan penelitian diawali dengan pemilihan dan identifikasi spesies tumbuhan, isolasi dan pemurnian, penentuan struktur senyawa aktif, uji aktivitas antikanker terhadap sel kanker (sel kanker murin leukemia P-388, sel kanker payudara MCF7, dan sel kanker rahim HeLa) serta analisis data. Metode penelitian yang digunakan untuk mencapai tujuan penelitian adalah sebagai berikut:

1. Pengumpulan Bahan Tumbuhan.

Bahan tumbuhan yang akan diteliti pada penelitian ini adalah tumbuhan endemik Indonesia yang belum pernah diteliti yakni *Melicope quercifolia*. Pemberian nama ilmiah spesies dari sampel tumbuhan diidentifikasi di Herbarium Bogoriensis, Bogor, Indonesia.

2. Preparasi Bahan Ekstrak, Fraksi-fraksi Aktif dan Senyawa Murni Hasil Isolasi

Ekstraksi senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam daun *Melicope* menggunakan metanol pada suhu kamar. Proses ekstraksi dilakukan sebanyak dua kali supaya senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam daun terekstrak secara sempurna. Ekstrak metanol yang diperoleh diasamkan dengan asam sulfat 5% (pH 3-4) selanjutnya dipartisi dengan pelarut *n*-heksana dan etilasetat menghasilkan ekstrak *n*-heksana dan etilasetat (ekstrak fenolik). Penambahan ammoniak NH_4OH (pH 8-9) pada fasa asam dan selanjutnya dipartisi dengan etil asetat menghasilkan ekstrak total alkaloid.

Ekstrak alkaloid maupun ekstrak fenolik dilakukan pemisahan menggunakan kolom vacuum cair menghasilkan beberapa fraksi utama. Pemisahan fraksi-fraksi utama yang berfluorisensi di bawah lampu UV selanjutnya menggunakan dengan kolom kromatografi, kolom tekan, sphadeks atau poliamida. Pemurnian senyawa menggunakan kromatografi radial (kromatotron) menghasilkan senyawa murni

3. Identifikasi dan Penentuan Struktur Senyawa Hasil Isolasi

Identifikasi dan penentuan struktur kimia senyawa hasil isolasi ditentukan dengan menggunakan spektroskopi UV, FTIR, MS dan NMR. Spektrum UV bertujuan untuk menentukan jenis kromofor sedangkan spektrum IR bertujuan menentukan gugus fungsi senyawa hasil isolasi. Analisis spektrum massa dalam riset ini menggunakan alat resolusi tinggi untuk menentukan massa molekul dan rumus molekul senyawa baru. Untuk senyawa yang sudah dikenal, spektrum NMR yang digunakan adalah 1D NMR yakni pengukuran ^1H dan ^{13}C NMR. Analisis spektrum 2D NMR seperti HMQC, HMBC,

COSY dan NOESY diukur untuk penentuan struktur senyawa-senyawa baru. Senyawa baru yang memiliki atom karbon kiral khususnya alkohol, maka konfigurasi absolutnya ditetapkan menggunakan pereaksi Mosher.

4. Kultur Sel

Sel kanker murin leukemia P-388, sel kanker payudara MCF7, dan sel kanker rahim HeLa.masing-masing ditumbuhkan dalam media kultur RPMI-1640 *Dulbecco's Modified Eagle Media* mengandung 10% *Foetal Bovine Serum* FBS (media pertumbuhan), 0,1 g/l streptomisin, penisilin 1×10^5 IU/l dan natrium bikarbonat ditambahkan akuabides sampai volumenya 1l pH 7,2-7,4 dan diinkubasi pada incubator CO₂ 10% pada suhu 37° C selama 5 hari. Terlebih dahulu media kultur dilakukan uji sterilisasi tioglikolat.

Tindakan membangunkan sel mieloma dilakukan *thawing* pada suhu 4 °C dilakukan sentrifugas: 1500 rpm selama 10 menit dan supernatan diambil dengan tujuan perbanyak sel kanker dalam media kultur RPMI 1640. Supernatan dalam media kultur RPMI 1640 yang mengandung 10% FBS ditanam pada sumuran mikroplat dan sel diinkubasi pada incubator CO₂ (10%) pada suhu 37 °C selama lima hari. Kriteria pertumbuhan sel yang telah *confluent* dan siap digunakan untuk uji senyawa aktif mengandung 5.10^4 - 10^5 sel/ml. Jumlah sel kanker yang hidup diamati di bawah mikroskop pada *haemocytometer*. Sel yang hidup akan berwarna karena menyerap indikator *phenol red* 1%.

5. Uji Aktivitas Antikanker

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen dengan menggunakan rancangan acak lengkap pada kultur sel murin leukemia P-388, sel kanker payudara MCF7, dan sel kanker rahim HeLa.menggunakan senyawa aktif hasil isolasi, kontrol positif (senyawa vinkristintin) dan kontrol negatif dalam berbagai konsentrasi/dosis minimal lima konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$ atau ppm) yang masing-masingnya 3 (tiga) replikat dalam sumuran mikroplat. Media kultur sebanyak 90 μl ditambahkan 10 μl larutan uji, kontrol positif (senyawa vinkristin) dan control negative diinkubasi dengan incubator CO₂ (10%) selama 48 jam lalu ditambahkan pereaksi warna MTT 1 g/l sebanyak 50 μl dan selanjutnya dinkubasi selama 4 jam. Penentuan jumlah sel kanker yang terinhibisi oleh larutan uji diamati dengan menggunakan *microplate reader* pada λ 540 nm dengan melarutkan sel dengan DMSO terlebih dahulu. Nilai *inhibition of concentration* IC₅₀ ditentukan dengan menggunakan analisis statistik program origin 7.0. Suatu senyawa dikatakan memiliki prospek sebagai senyawa antikanker apabila nilai IC₅₀-nya ≤ 4 ppm (atau $\leq 20 \mu\text{M}$) (Alley, *et.al.*, 1998).

Sumuran mikroplat kultur sel	Uji aktivitas senyawa aktif pada kultur sel dalam sumuran mikroplat	Pengamatan
<input type="radio"/> <input type="radio"/> <input type="radio"/> <input type="radio"/> <input type="radio"/> <input type="radio"/> <input type="radio"/> <input type="radio"/> <input type="radio"/> <input type="radio"/> <input type="radio"/> <input type="radio"/> <input type="radio"/> <input type="radio"/> <input type="radio"/>	Konsentrasi senyawa aktif, kontrol positif dan kontrol negatif dalam berbagai konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$ atau ppm) minimal 5 konsentrasi	Observasi pertumbuhan kultur sel setelah 48 jam perlakuan dan perhitungan sel

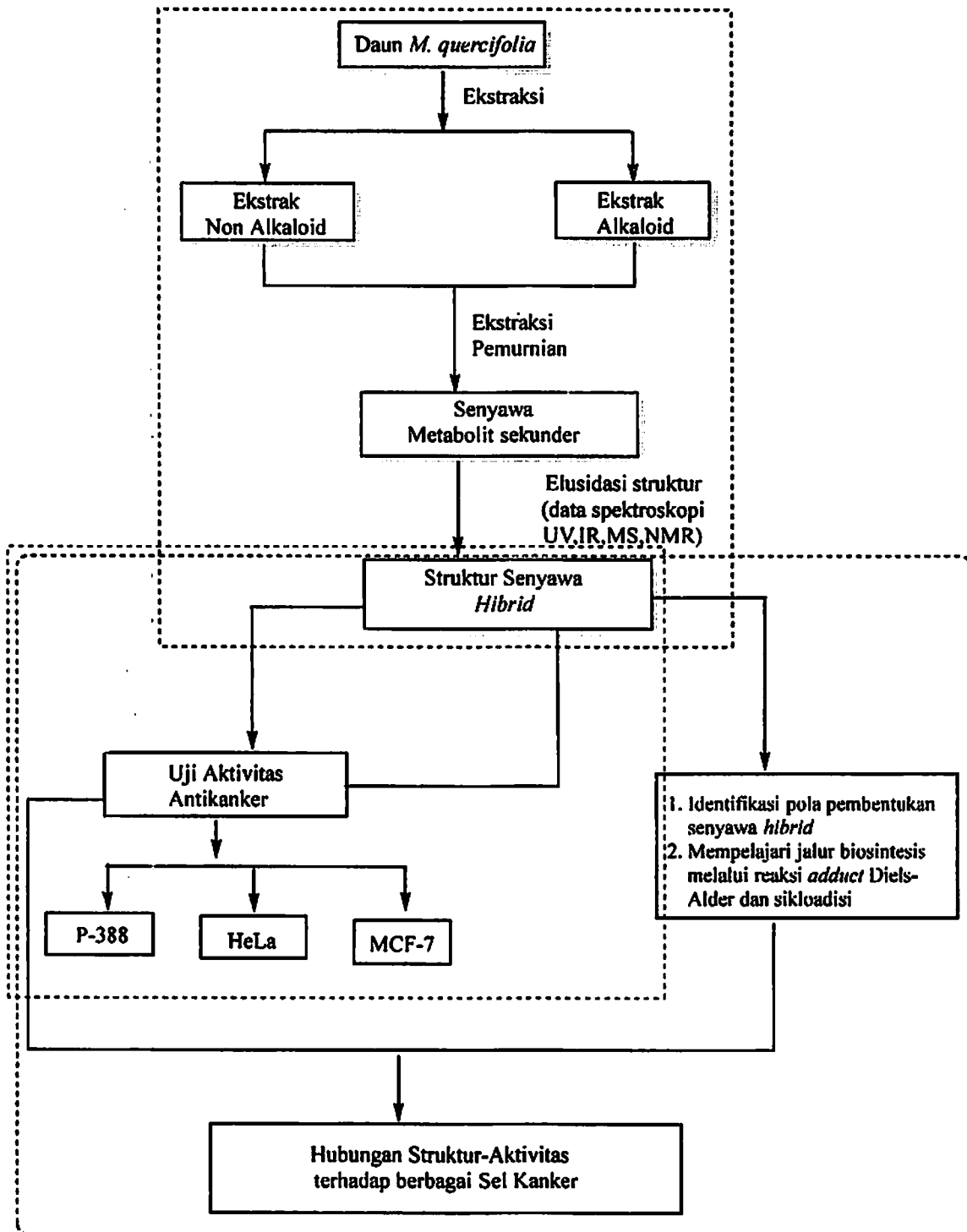
5. Observasi Morfologi Sel Kanker

Uji senyawa aktif hasil isolasi dalam berbagai konsentrasi/dosis terhadap sel kanker dievaluasi dengan scanning elektron mikroskopi SEM dan transmisi elektron mikroskopi TEM. Visualisasi histologi sel kanker pada alat SEM dan TEM terlihat setelah pewarnaan konvensional dengan larutan akridin orange dan etidium bromida

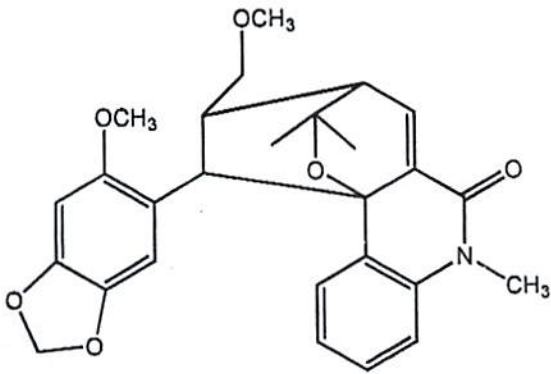
6. Analisis Hubungan Struktur dan Aktivitas. Antikanker

Analisis hubungan struktur dan aktivitas dari masing-masing senyawa uji tersebut akan dilakukan berdasarkan nilai IC_{50} terhadap variasi struktur. Berdasarkan hasil analisis tersebut, gugus-gugus fungsi yang bertanggung jawab terhadap aktivitas (farmakofor) dapat ditentukan.

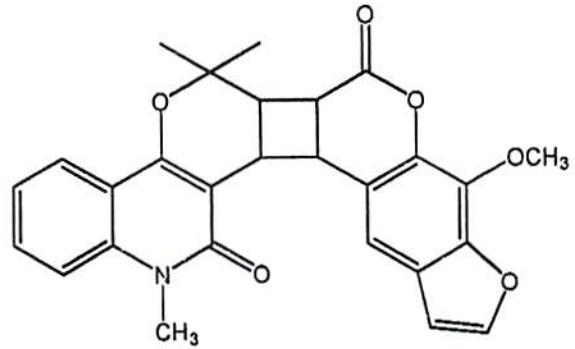
Adapun *road map* penelitian tentang Keragaman Senyawa *Hibrid* Tumbuhan *M. quercifolia* Dalam Rangka Produksi Senyawa Antikanker Baru ini adalah sebagai berikut,



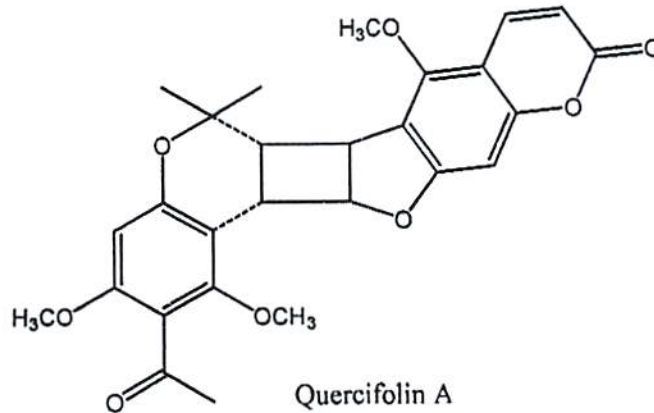
Gambar 4.1. Diagram alir penelitian

BAB V**HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI****5.1 Hasil Senyawa yang Diperoleh dari *Melicope quercifolia***

Melikodin H



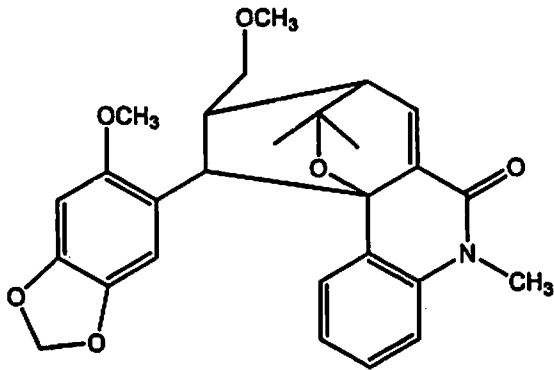
Melikodin F



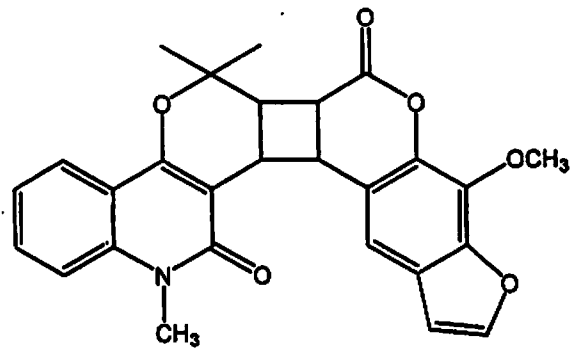
Quercifolin A

5.2 Hasil Uji antikanker Senyawa Hasil Isolasi terhadap sel kanker**Tabel-5.1.** Hasil Aktivitas antikanker senyawa hasil isolasi *Melicope quercifolia*

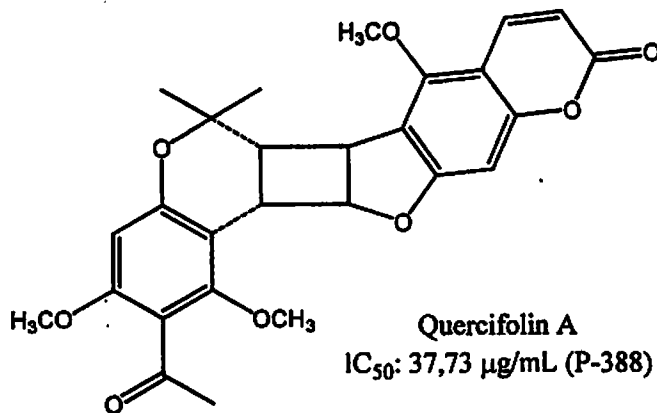
Senyawa	Aktivitas sitotoksik (IC ₅₀ , µg/mL)
	Sel murin (P-388)
Melikodin F	17,49
Melikodin H	90,00
Quercifolin A	37,73
Artonin E	1,33
Duxorobicin	-



Melikodin H
 IC_{50} : 17,49 $\mu\text{g/mL}$ (P-388)



Melikodin F
 IC_{50} : 90,0 $\mu\text{g/mL}$ (P-388)



Quercifolin A
 IC_{50} : 37,73 $\mu\text{g/mL}$ (P-388)

Hasil publikasi yang telah dicapai dalam penelitian tim pascasarjana 2018 menghasilkan dua senyawa melikodin F-H dan senyawa baru Quercifolin A telah diujikan aktivitas antikanker terhadap sel kanker murin leukemia P-388 dan Tahun-II akan dilanjutkan untuk isolasi senyawa minor dari tumbuhan *Melicope quercifolia* serta senyawa yang diperoleh dari Tahun-I dan Tahun-II akan dilanjutkan dengan pengujian aktivitas antikanker dengan tiga sel kanker manusia. Di samping itu, sedang ditentukan putaran optik senyawa sehingga diharapkan pengumpulan data tersebut dapat ditulis pada jurnal yang terindeks scopus pada Tahun II seperti terlampir di bawah ini:

No	Jurnal	Judul	Ranking Jurnal/Publisher
1	Natural Product Science (Tahun I)	Meliglabrin, A New Flavonol Derivative from the leaves of <i>Melicope glabra</i> (Blume) T.G. Hartley (SUDAH PUBLISHED, 10 Nov 2018)	Q3, Scopus
1.	Natural Product Research	A new hybrid of alkaloid-coumarin and cinnamic acid from the leaves of <i>Melicope quercifolia</i>	Q2: Taylor and Francis (Draft)

1. Jurnal terindeks SCOPUS (Tahun-I)



Natural Product Sciences

24(3): 155-158 (2018)

<https://doi.org/10.20307/nps.2018.24.3.155>

Meliglabrin, A New Flavonol Derivative from the leaves of *Melicope glabra* (Blume) T.G. Hartley

Ratih Dewi Saputri, Ijtjik Sri Tjabjandarte, and Mulyadi Tanjung*

*Natural Products Chemistry Research Group, Organic Chemistry Division, Department of Chemistry,
Faculty of Science and Technology, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia*

Abstract – A new flavonol derivative, meliglabrin (1) along with three known flavonols, ternatin (2), melibernatin (3), and 5,4'-dihydroxy-3,7,8-trimethoxyflavon (4) were isolated from the leaves of *Melicope glabra* (Blume) T.G. Hartley. Their structures were determined using extensive spectroscopic methods, including UV, IR, HRESIMS, 1D and 2D NMR. Compounds 1-4 were evaluated for their cytotoxicity against murine leukemia P-388 cells, compound 4 showed moderate activity.

Keywords – Meliglabrin, flavonol, *Melicope glabra*, P-388 cells

BAB VI

RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Penyelesaian tahap akhir sudah terlaksana dan akan dilakukan penelitian lebih lanjut untuk **Tahun-II**. Sehingga pada akhir penelitian (**Tahun II**) dapat tercapainya tujuan dari penelitian, dimana akan dihasilkan data lengkap hasil aktivitas antikanker untuk senyawa minor hasil isolasi dari daun tumbuhan *Melicope quercifolia* serta uji aktivitas antikanker terhadap tiga sel manusia yaitu sel murin P-388, sel MCF7, dan sel HeLa sehingga akan diketahui korelasi antara senyawa hasil isolasi dengan aktivitas sebagai antikanker. Selain itu, dapat terpublishkan jurnal terindex **Taylor and Francis** pada **Tahun II** hasil dari penelitian tersebut.

No	Kegiatan (Tahun-2)	Jumlah	Jadwal	Tempat
1	Isolasi senyawa minor daun <i>Melicope quercifolia</i>	5	Maret 2019	Lab penelitian Dept Kimia, UA
1	Analisis Antikanker Sel HeLa, Sel P-388 dan MCF-7	5	Mei 2019	Laboratorium Parasitologi, Fak Kedokteran Universitas Gadjah Mada
2	Publikasi internasional	1	Juli 2019	-
3	Penyusunan Laporan Akhir	1	November 2019	Departemen Kimia, UA

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

BAB VII

KESIMPULAN

1. Dari hasil penelitian **Tahun I**, dihasilkan senyawa aktif terhadap antikanker leukemia dari daun *Melicope quercifolia* yang terdiri dari senyawa **Melikodin F-H** dan satu senyawa baru yaitu **Quercifolin A**.
2. Berdasarkan hasil penelitian **Tahun I** telah dihasilkan jurnal terindex scopus yang telah publish dan pada **Tahun II** akan di publish pada jurnal Taylor and Francis seperti terlampir di bawah ini:

No	Jurnal	Judul	Ranking Jurnal/Publisher
1.	Natural Product Science (Tahun I)	Meliglabrin, A New Flavonol Derivative from the leaves of <i>Melicope glabra</i> (Blume) T.G. Hartley (SUDAH PUBLISHED, 10 Nov 2018)	Q3, Scopus
2.	Natural Product Research (Tahun II)	A new hybrid of alkaloid-coumarin and cynamic acid from the leaves of <i>Melicope quercifolia</i>	Q2: Taylor and Francis (Next Project)

SARAN

Dari hasil penelitian **Tahun-I**, diharapkan pada **Tahun-II** dapat dilanjutkan untuk uji antikanker terhadap berbagai sel kanker lain dan selanjutnya dapat diujikan terhadap sitotoksik senyawa dan uji *In vivo* aktivitas antikanker sehingga dapat dijadikan kandidat obat kanker.



DAFTAR PUSTAKA

- Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, Abbot, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H., dan Boyd, M.R., (1998): Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cells Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay, *Cancer Res.*, 48, 589-601.
- George, S., Nair, S. A., Venkataraman, R., Baby, S, (2017): Melicodenine I, A New Quinolinone Alkaloid from *Melicope denhamii* Leaves, *Nat. Prod. Res.*, 31, 890-895.
- Heyne, K., 1987, *Tumbuhan Berguna Indonesia*, Departemen Kehutanan., Jakarta
- Nakashima, K. I., Oyama, M., Ito, T., Witono, J. R., Darnaedi, D., Tanaka, T., Murata, J., Inuma, M., 2011, Melicodenines A and B, Novel Diels–Alder Type Adducts Isolated from *Melicope denhamii*, *Tetrahedron Letter*, 52, 4694–4696.
- Nakashima, K. I., Oyama, M., Ito, T., Witono, J. R., Darnaedi, D., Tanaka, T., Murata, J., Inuma, M., 2012, Novel Quinolinone Alkaloids Bearing a Lignoid Moiety and Related Constituents in the Leaves of *Melicope denhamii*, *Tetrahedron Letter*, 68, 2421-2428.
- Tanjung, M., Hakim, E.H., Mujahidin, D., Hanafi, M., dan Syah, Y.M., (2009): Macagigantin, A Farnesylated Flavonol from *Macaranga gigantea*, *Asian Nat. Prod. Res.*, 11, 929-932.
- Tanjung, M., Hakim, E.H., Elfahmi, Latip, J., and Syah, Y.M., (2010): Geranylated Flavonols from *Macaranga rhizinoides*, *J. Nat. Prod Comm.*, 5, 1209-1211.
- Tanjung, M., Hakim, E.H., Mujahidin, D., Darmawan, A., and Syah, Y.M., (2012): Dihydroflavonol and Flavonol Derivatives from *Macaranga recurvata*, *J. Nat. Prod Comm.*, 7(10), 1309-1310.
- Tanjung, M., Tjahjandarie, T.S., and Sentosa, M.H., (2013): Antioxidant and Cytotoxic Agent from the Rhizomes of *Kaempferia pandurata*, *Asian Pac. J. Tro Dis.*, 3(5), 401-404.
- Tanjung, M., Saputri, R.D., and Tjahjandarie, T.S., (2016): 5,9,11-Trihydroxy-2,2-dimethyl-10-(3'-methyl-2'-butenyl)-3-(2"-methyl-3"-butenyl)pyrano[2,3-a]xanthen-12(2H)-one from the stem bark of *Calophyllum pseudomole*, *Molbank.*, M906.
- Tanjung, M., Saputri, R.D., Wahjoedi, R.A., and Tjahjandarie, T.S., (2017): 4-Methoxy-3-(3-methylbut-2-en-1-yl)-7-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)quinolin-2(1H)-one from *Melicope moluccana* T.G. Hartley, *Molbank.*, M939.



MILIK
 PERPUSTAKAAN
 UNIVERSITAS AIRLANGGA
 SURABAYA

LAMPIRAN JURNAL



Natural Product Sciences

24(3): 155-158 (2018)

<https://doi.org/10.29507/nps.2018.24.3.155>

Meliglabrin, A New Flavonol Derivative from the leaves of *Melicope glabra* (Blume) T.G. Hartley

Ratih Dewi Saputri, IJRIK Sri Jahjandarte, and Mulyadi Tanjung*

Natural Products Chemistry Research Group, Organic Chemistry Division, Department of Chemistry,
Faculty of Science and Technology, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

Abstract – A new flavonol derivative, meliglabrin (1) along with three known flavonols, ternatin (2), meliteratin (3), and 5,4'-dihydroxy-5,7,3'-trimethoxylavon (4) were isolated from the leaves of *Melicope glabra* (Blume) T.G. Hartley. Their structures were determined using extensive spectroscopic methods, including UV, IR, HRESIMS, 1D and 2D NMR. Compounds 1-4 were evaluated for their cytotoxicity against murine leukemia P-388 cells, compound 4 showed moderate activity.

Keywords – Meliglabrin; Flavonol; *Melicope glabra*; P-388 cells

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA



Meliglabrin, A New Flavonol Derivative from the leaves of *Melicope glabra* (Blume) T.G Hartley

Ratih Dewi Saputri, Tjitjik Srie Tjahjandarie, and Mulyadi Tanjung*

Natural Products Chemistry Research Group, Organic Chemistry Division, Department of Chemistry,
Faculty of Science and Technology, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

Abstract – A new flavonol derivative, meliglabrin (1) along with three known flavonols, tematin (2), meliternatin (3), and 5,4'-dihydroxy-3,7,3'-trimethoxyflavon (4) were isolated from the leaves of *Melicope glabra* (Blume) T.G Hartley. Their structures were determined using extensive spectroscopic methods, including UV, IR, HRESIMS, 1D and 2D NMR. Compounds 1 - 4 were evaluated for their cytotoxicity against murine leukemia P-388 cells, compound 4 showed moderate activity.

Keywords – Meliglabrin; flavonol, *Melicope glabra*, P-388 cells

Introduction

Melicope glabra (Blume) T.G. Hartley locally known as 'Ki Sampang' belongs to the Rutaceae family found in all of Indonesia Island. The aqueous decoction of leaves of *M. glabra* are used in Indonesia as traditional medicine for the treatment of fever, infections, and cough.¹ The *Melicope* genus has been shown to be prolific a number of secondary metabolites, particularly alkaloids,^{2,3} flavonoids,^{4,5} coumarins^{6,7} and showed biological activities such as anticancer, antifungal and antioxidant.

The phytochemical survey from the bark of *M. glabra* were isolated coumarins and lignan but the leaves until now has not been reported.⁶ In this paper, we wish to report the isolation and structural elucidation of a new flavonol, meliglabrin (1) along with three known compounds, tematin (2), meliternatin (3), and 5,4'-dihydroxy-3,7,3'-trimethoxyflavon (4) from the leaves of *M. glabra*. The cytotoxic activity of compounds 1 - 4 against murine leukemia P-388 cells from this plant are also reported.

Experimental

General experimental procedures – UV spectra were measured with a Shimadzu 1800 spectrometer, FTIR spectrum One Perkin-Elmer instrument, respectively. ¹H

* Author for correspondence
Mulyadi Tanjung, Natural Products Chemistry Research Group,
Organic Chemistry Division, Department of Chemistry, Faculty of
Science and Technology, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia
Tel: +62-31-5936501; E-mail: mulyadi-t@fst.unair.ac.id

and ¹³C NMR spectra were recorded with a JEOL ECA 400 spectrometer operating at 400 (¹H) and 100 (¹³C) MHz in CDCl₃. Mass spectra were measured on an ESI-TOF Waters LCT Premier XE producing pseudo-molecular ions, [M-H]⁻ negative ion mode. Vacuum liquid chromatography (VLC) and planar radial chromatography were carried out using Si gel 60 GF₂₅₄ and Si gel 60 PF₂₅₄, for TLC analysis, pre-coated silica gel plates (Merck Kieselgel 60 GF₂₅₄, 0.25 mm thickness) were used.

Plant materials – The leaves of *M. glabra* were collected in March 2017 from Gunung Salak, Bogor, West Java, Indonesia. The plant material was identified by Mr. Ismail Rachman from the Herbarium Bogoriense, Bogor. A voucher specimen (PL 60325) was deposited in Herbarium Bogoriense, Center of Biological Research and Development, National Institute of Science, Bogor, Indonesia.

Extraction and isolation – The powdered and dried leaves of *M. glabra* (1.7 kg) were macerated in methanol at room temperature two times and, after evaporation of the methanol extract, gave a dark residue (210 g). The extract was redissolved in MeOH-water (9:1) and partitioned with *n*-hexane (95 g) and ethyl acetate (30 g) fractions. The ethylacetate extract (29 g) was further fractionated by vacuum liquid chromatography on silica gel (150 g) eluted with *n*-hexane-ethyl acetate of increasing polarity (9:1, 4:1; 7:3, 1:1, and 1:4) to give three major fractions A-C. Fraction A (4.68 g) was separated by column chromatography eluted with *n*-hexane-ethyl acetate (9:1 to 7:3) to produce subfractions A₁-A₃. Subfraction A₁

was purified by planar radial chromatography using *n*-hexane-CHCl₃ (from 4:1 to 1:4) to yield compound 1 (20 mg), 3 (15 mg), and 4 (23 mg). Fraction B (13 g) was refractionated using column chromatography and eluted *n*-hexane- ethyl acetate (from 8:2 to 3:7) to produce subfractions B₁-B₂. Subfraction B₁ was purified by planar radial chromatography using *n*-hexane-acetone (from 9:1 to 1:1) to yield compound 2 (9 mg).

Meliglabrin (1) – Yellow solid, mp. 119 - 121 °C, UV (MeOH) λ_{max} nm (log ε) : 245 (4.20), 255 (3.99), 296 (4.01) and 344 (4.20). IR (KBr) ν_{max} cm⁻¹: 3421, 1645, 1560, 1481 and 1132. ¹H and ¹³C NMR see Table 1. HRESIMS: *m/z* [M-H]⁻ calcd. for C₁₈H₁₃O₈ 357.0610, found 357.0613.

Ternatin (2) – Yellow solid. ¹H NMR (CDCl₃ 400 MHz): δ_H 12.44 (1H, s, 5-OH), 7.79 (1H, dd, *J* = 9.1, 2.0 Hz, H-6'), 7.78 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 7.06 (1H, d, *J* = 9.1 Hz, H-5'), 6.42 (1H, s, H-6), 6.01 (1H, s, 4'-OH), 3.98 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.94 (3H, s, 7-OCH₃), 3.92 (3H, s, 8-OCH₃), 3.87 (3H, s, 3-OCH₃). ¹³C NMR (CDCl₃ 100 MHz): δ_C 179.1 (C-4), 158.4 (C-7), 157.4 (C-5), 155.8 (C-2), 148.5 (C-8a/4'), 146.4 (C-3'), 139.4 (C-3), 122.9 (C-6'), 128.8 (C-8), 122.7 (C-1'), 114.8 (C-5'), 110.8 (C-2'), 105.4 (C-4a), 95.5 (C-6), 61.7 (8-OCH₃), 60.2 (3-OCH₃), 56.5 (7-OCH₃), 56.1 (3'-OCH₃). HRESIMS: *m/z* [M-H]⁻ calcd. for C₁₉H₁₇O₈ 373.1916, found 373.1912.

The ¹H and ¹³C NMR spectral data are consistent with published data.⁸

Meliteratin (3) – Pale white solid, mp. 167 - 169 °C. UV (MeOH) λ_{max} nm (log ε) : 247 (4.22), 270 (4.08) and 336 (4.34). IR (KBr) ν_{max} cm⁻¹: 1641, 1524, 1479 and 1114. ¹H NMR (CDCl₃ 400 MHz): δ_H 7.63 (1H, dd, *J* = 8.4, 1.8 Hz, H-6'), 7.56 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2'), 6.91 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5'), 6.65 (1H, s, H-8), 6.05 (2H, s, 3',4'-OCH₂-O), 6.04 (2H, s, 6,7-OCH₂-O), 4.12 (3H, s, 5-OCH₃), 3.86 (3H, s, 3-OCH₃). ¹³C NMR (CDCl₃ 100 MHz): δ_C 174.0 (C-4), 153.7 (C-7), 153.7 (C-8a), 153.0 (C-4'), 152.6 (C-2), 149.4 (C-3'), 141.1 (C-5), 140.8 (C-3), 134.8 (C-6), 124.5 (C-1'), 123.1 (C-6'), 113.1 (C-4a), 108.5 (C-5'; 3',4'-OCH₂-O), 108.4 (C-2'; 6,7-OCH₂-O), 93.0 (C-8), 61.3 (5-OCH₃), 59.9 (3-OCH₃). HRESIMS: *m/z* [M-H]⁻ calcd. for C₁₈H₁₃O₈ 357.0610, found 357.0613. The ¹H and ¹³C NMR spectral data are consistent with published data.⁹

5,4'-Dihydroxy-3,7,3'-trimethoxyflavon (4) – Yellow solid, ¹H NMR (acetone-*d*₆, 400 MHz): δ_H 12.72 (1H, s, 5-OH), 8.64 (1H, s, 4'-OH), 7.75 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 7.67 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, H-6'), 6.97 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5'), 6.62 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-8), 6.27 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-6), 3.91 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.87 (3H, s, 7-OCH₃), 3.86 (3H, s, 3-OCH₃). ¹³C NMR (acetone-*d*₆, 100 MHz): δ_C 179.5 (C-4), 166.5 (C-7), 162.7 (C-5), 157.6

Table 1. NMR Spectroscopic data (400 MHz in CDCl₃) for meliglabrin (1)

No.C	δ _H (mult, <i>J</i> in Hz)	δ _C	HMBC
2	-	155.8	-
3	-	138.2	-
4	-	179.3	-
4a	-	106.3	-
5	-	151.8	-
6	-	130.1	-
7	-	155.1	-
8	6.54 (s, 1H)	93.2	C-4a, C-6, C-7, C-8a
8a	-	153.9	-
1'	-	124.2	-
2'	7.59 (d, 1.8, 1H)	108.7	C-2, C-4', C-6'
3'	-	149.7	-
4'	-	150.0	-
5'	6.95 (d, 8.4, 1H)	108.6	C-1', C-3'
6'	7.68 (dd, 8.4; 1.8, 1H)	123.8	C-2, C-2', C-4'
5-OH	12.88 (s, 1H)	-	C-4a, C-5, C-6
7-OH	6.50 (s, 1H)	-	C-7, C-8
3-OCH ₃	3.85 (s, 3H)	61.0	C-3
6-OCH ₃	4.04 (s, 3H)	60.3	C-6
3',4'-OCH ₂ -O	6.08 (s, 2H)	101.8	C-3', C-4'

(C-8a), 156.8 (C-2), 150.5 (C-4'), 148.2 (C-3'), 139.3 (C-3), 123.3 (C-6'), 122.6 (C-1'), 116.1 (C-5'), 112.5 (C-2'), 106.4 (C-4a), 98.4 (C-6), 92.8 (C-8), 61.3 (3'-OCH₃), 56.4 (7-OCH₃), 56.5 (3-OCH₃). HRESIMS: m/z [M-H]⁻ calcd. for C₁₈H₁₇O₇ 344.0896, found 344.0900. The ¹H and ¹³C NMR spectral data are consistent with published data.¹⁰

Cytotoxic activity—All isolated compounds (1-4) were subjected to cytotoxic evaluation against murine leukemia P-388 cells according to the MTT method with artonin E as the positive control.¹¹⁻¹² The P-388 cells were seeded into each 96-well cell culture plate at a density of 3 × 10⁴ cells/well and incubated at 37 °C for 48 h. The number of cells that inhibited by each of compounds 1-4 were measured using microplate reader spectrometer at λ 540 nm after incubation for 24 hours in CO₂ incubator at 37 °C. All of isolated compounds by variations in concentration of 1000; 100; 30; 10; 3; 1; 0.3 and 0.1 μg/mL with triplicate treatment tested on cell cultures murine leukemia P-388. The IC₅₀ value₅₀ can be calculated through extrapolation 50% absorption lines to various concentrations of each compound using regression analysis.

Result and Discussion

Compound (1) was isolated as yellow solid, mp. 119-121 °C. The HRESIMS displayed a negative molecular ion peak [M-H]⁻ at m/z 357.0613 (calcd. 357.0610) indicating a molecular formula of C₁₈H₁₄O₈. The UV maximum absorption at λ_{max} 245 (4.20), 255 (3.99), 296 (4.01) and 344 (4.20) nm typical for a flavonol chromophore.¹² The IR spectrum indicated absorptions for hydroxyl (3421 cm⁻¹), conjugated carbonyl (1645 cm⁻¹), aromatic (1560 - 1481 cm⁻¹) and ether (1132 cm⁻¹) groups,

respectively¹³. The ¹H NMR (Table 1) spectrum of 1 showed an ABX system at δ_H 7.68 (1H, dd, $J=8.4$; 1.8 Hz, H-6'), 7.59 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-2'), 6.95 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), and a singlet at δ_H 6.54 (1H, s, H-8) in the aromatic region. The ¹H NMR spectrum of 1 also showed a chelated hydroxyl group at δ_H 12.88 (1H, s, 5-OH), a hydroxyl signals at δ_H 6.50 (1H, s, 7-OH), two methoxyls at δ_H 4.04 (3H, s, 6-OCH₃), 3.85 (3H, s, 3-OCH₃), and a methylenedioxy at δ_H 6.08 (2H, s, 3',4'-OCH₂-O). Eighteen carbon signals were observed by ¹³C NMR spectrum. Two of them signals at δ_C 138.2 and δ_C 179.3 are characteristic for C-3 and C-4 of a flavonol structure.¹² The placement of hydroxyl, methoxyl and methylenedioxy groups in flavonol structure was established by HMQC and HMBC spectra (Fig. 2). The proton signal of a chelated hydroxyl group (δ_H 12.33, 5-OH) correlated with three quaternary carbons [δ_C 151.8 (C-5); 130.1 (C-6); 106.3 (C-4a)]. The proton signal of methoxyl group at δ_H 4.04 correlated to δ_C 130.1 (C-6) showing that a methoxyl group was placed at C-6. A hydroxyl proton signal at δ_H 6.50 (7-OH) correlated with one quaternary carbon signal δ_C 155.1 (C-7), and one methine carbon signal δ_C 93.2 (C-8) indicating that a hydroxyl group was placed at C-7. The aromatic proton signal (δ_H 6.54, H-8) showed long-range correlations with four quaternary carbons [δ_C 155.1 (C-7), 153.9 (C-8a)], 130.1 (C-6); 106.3 (C-4a)]. In the ¹H NMR spectrum, proton signal of an ABX system in the aromatic region at ring B indicated a methylenedioxy group fused at C-3' and C-4'. Therefore, another methoxyl group was placed at C-3. The proton signal of methoxyl group at δ_H 3.85 correlated to δ_C 138.2 showing that a methoxyl group was placed at C-3. The proton signal of a methylenedioxy group (δ_H 6.08, 3',4'-OCH₂-O-) showed long-range correlations with two

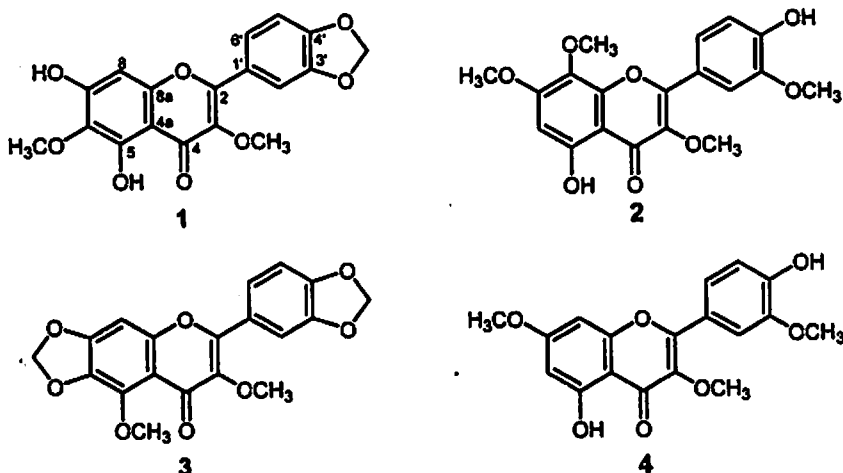


Fig. 1. Flavonols 1-4 isolated from the leaves of *M. glabra*.

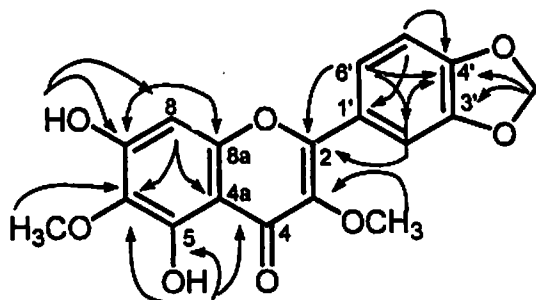


Fig. 2. Selected HMBC correlations for compound 1.

Table 2. Cytotoxicity activity of compounds 1 - 4 against murine leukemia P-388 cells

Compounds	IC ₅₀ (µg/mL)
Meliglabrin (1)	48.30 ± 1.65
Tematin (2)	15.98 ± 1.05
Melitematin (3)	30.04 ± 1.78
5,4'-Dihydroxy-3,7,3'-trimethoxyflavon (4)	5.02 ± 0.45

quaternary carbons at δ_C 149.7 (C-3') and δ_C 150.0 (C-4'). One of aromatic proton signal of ABX system (δ_H 7.59, H-2') showed correlations with two quaternary carbons δ_C 155.8 (C-2), 150.0 (C-4'), and one methine carbon signal δ_C 123.8 (C-6'). The aromatic proton signal (δ_H 6.95, H-5') showed correlations with two quaternary carbons δ_C 124.2 (C-1'), and 149.7 (C-3'). Furthermore, the aromatic proton signal (δ_H 7.68, H-6') showed correlations with two quaternary carbons δ_C 155.8 (C-2), 150.0 (C-4'), and one methine carbon signal δ_C 108.7 (C-2'). From these NMR data analysis, meliglabrin (1) was assigned as 5,7-dihydroxy-3,6-dimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavone. Other HMBC correlations consistent with the structure 1 are shown in Table 1 and Fig. 2.

The isolated compounds 1 - 4 were assessed for their anticancer activity against murine leukemia P-388 cells. The result of anticancer activity are presented in Table 2, showing their IC₅₀ were 48.30, 15.98, 30.04, and 5.02 µg/mL, respectively (artoinin E as a positive control, IC₅₀ 1.33 µg/mL). These anticancer activity data suggested that the compounds 1 - 3 were inactive and compound 4 showed moderate activity. The hydroxy group at C-4' and methoxy group at C-3' (compounds 2 and 4) enhances activity than methylenedioxy group at C-3' and C-4'

(compounds 1 and 3). The same thing, the structure-activity relationship of flavonol from *M. triphylla*, the presence of hydroxy group at C-4' and methoxy group at C-3' showed moderate activity against murine leukemia P-388 cells.¹⁴ The presence of methoxy group at C-8 in compound 2 decreases anticancer activity compared to compound 4.

Acknowledgments

This research was supported by Universitas Airlangga, Ministry of Research, Technology and Higher Education, Republic of Indonesia (Penelitian Hibah Mandat, Universitas Airlangga, 2018).

References

- (1) Hartley, T. *Sundakanan*. 1994, 4, 47-74.
- (2) Nakashima, K.; Oyama, M.; Ito, T.; Akao, Y.; Witono, J. R.; Damaedi, D.; Tanaka, T.; Murata, J.; Inuma, M. *Tetrahedron*. 2012, 68, 2421-2428.
- (3) Tanjung, M.; Saputri, R. D.; Wahjoedi, R. A.; Tjahjandarie, T. S. *Molbank* 2017, M939, 1-5.
- (4) Simonsen, H. T.; Adsersen, A.; Bremner, P.; Heinrich, M.; Wagner Smitt, U.; Jaroszewski, J. W. *Phytother. Res.* 2004, 18, 542-545.
- (5) Chung, L. Y.; Yap, K. F.; Goh, S. H.; Mustafa, M. R.; Imiyabir, Z. *Phytochemistry* 2008, 69, 1548-1554.
- (6) Kassim, N. K.; Rahman, M.; Ismail, A.; Sukari, M. A.; Ee, G. C.; Nasir, N. M.; Awang, K. *Food. Chem.* 2013, 139, 87-92.
- (7) Oyama, M.; Nakashima, K.; Kamiya, T.; Haba, M.; Ito, T.; Murata, H.; Tanaka, T.; Adachi, T.; Inuma, M.; Kinoshita, T. *Phytochem. Lett.* 2013, 6, 215-218.
- (8) Camble, R. C.; Pan, Y. J.; Bowden, B. F. *Biochem. Syst. Ecol.* 1996, 24, 461-462.
- (9) Chung, L. Y.; Yap, K. F.; Goh, S. H.; Mustafa, M. R.; Imiyabir, Z. *Phytochemistry* 2008, 69, 1548-1554.
- (10) Higa, M.; Imamura, M.; Ogihara, K.; Suzuka, T. *Chem. Pharm. Bull.* 2013, 61, 384-389.
- (11) Tanjung, M.; Hakim, E. H.; Syah, Y. M. *Chem. Nat. Comp.* 2017, 53, 215-218.
- (12) Tanjung, M.; Hakim, E. H.; Elfahmi, Latip, J.; Syah, Y. M. *Nat. Prod. Commun.* 2012, 10, 1309-1310.
- (13) Tjahjandarie, T. S.; Pudjiastuti, P.; Saputri, R. D.; Tanjung, M. J. *Chem. Pharm. Res.* 2014, 6, 786-790.
- (14) Hou, R. S.; Duh, C. Y.; Wang, S. K.; Chang, T. T. *Phytochemistry* 1994, 35, 271-272.

Received February 11, 2018

Revised February 27, 2018

Accepted March 10, 2018

