



LAPORAN PENELITIAN FUNDAMENTAL
TAHUN ANGGARAN 2008

SENYAWA FLAVONOID DAN ALKALOID DARI
Saccopetalim horsfieldii Benn.
SEBAGAI APOPTOSIS DAN HUBUNGAN
STRUKTUR-AKTIVITAS ANTIKANKER

Oleh :
Drs. Mulyadi Tanjung, M.S.
Dr. Alfinda Novi Kristanti, DEA.
Dr. Nanik Siti Aminah, M.Si.

LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional,
Sesuai surat Perjanjian Pelaksanaan Desentralisasi Penelitian
Nomor : 319/SP2H/PP/DP2M/III/2008, tanggal 5 Maret 2008

Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Airlangga

Tahun 2008


LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN

1	a. Judul Penelitian : Senyawa Flavonoid dan Alkaloid Antikanker dari <i>Saccopetalum horsfieldii</i> Benn Sebagai Apoptosis dan Hubungan Struktur-Aktivitas Antikanker b. Macam Penelitian : Fundamental c. Kategori Penelitian : II	
2	Ketua Peneliti : a. Nama : Drs. Mulyadi Tanjung, MS. b. Pangkat/Golongan/NIP : Penata Tk. I/ IV-a/131932687 c. Jabatan : Lektor Kepala d. Fakultas/Jurusan : Saintek/Kimia e. Universitas : Universitas Airlangga f. Bidang Ilmu yang Diteliti : Kimia Organik Bahan Alam	
3	Jangka Waktu Penelitian	: 6 (enam) bulan
4	Lokasi Penelitian	: Kimia Organik, FMIPA Unair
5	Kerjasama dengan Instansi Lain	: -
6	Biaya yang Diperlukan	: Rp.25.000.000.,


Surabaya, 27-11-2008

Mengetahui Dekan
Fakultas Saintek


Ketua Peneliti



Drs. Salamun, M.Kes.
NIP. 131696506



Drs. Mulyadi Tanjung, MS
NIP. 131932687



Menyetujui
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat
Universitas Airlangga



Dr. Bambang Sektiari L., DEA.
NIP. 131837004

RINGKASAN

Senyawa Flavonoid dan Alkaloid Antikanker dari *Saccopetalum horsfieldii* Benn Sebagai Apoptosis dan Hubungan Struktur-Aktivitas Antikanker (Mulyadi Tanjung, Alfinda Novi Kristanti, Nanik Siti Aminah, 2009, Fakultas Sains dan Teknologi, 43 halaman)

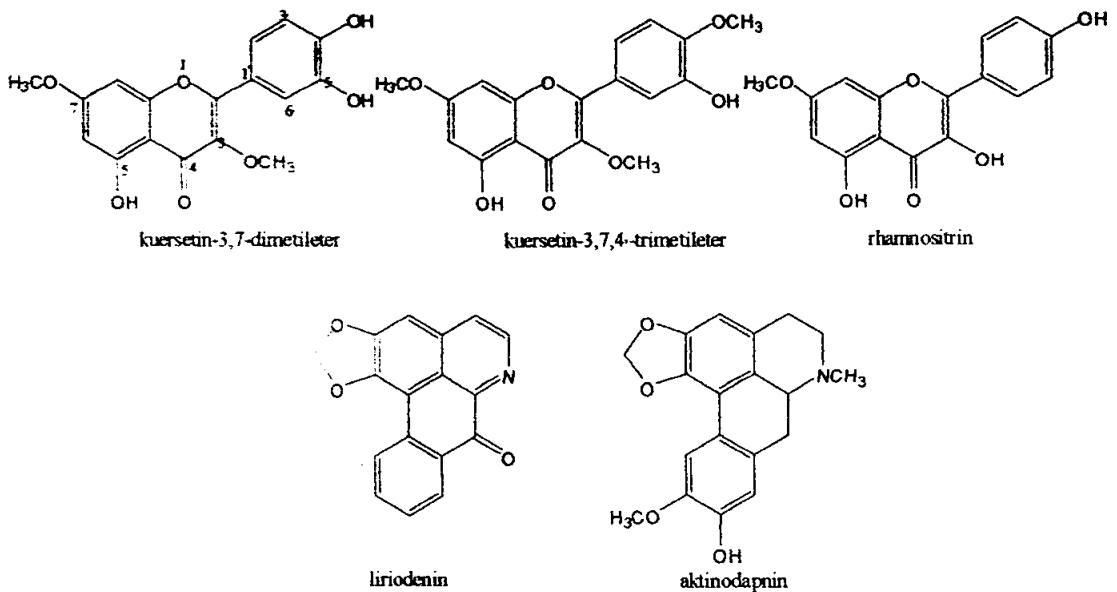
Kanker merupakan suatu yang menduduki peringkat atas penyebab kematian setelah penyakit jantung.. Senyawa taksol dan vinkristin merupakan senyawa alam yang banyak digunakan dalam terapi kanker saat ini tetapi mengingat persediaan tanaman yang memproduksi senyawa tersebut sangat terbatas maka perlu alternatif dari tanaman yang lain.

Saccopetalum horsfieldii Benn merupakan tanaman endemik Indonesia yang termasuk dalam famili Annonaceae. Kandungan senyawa kimia yang terdapat pada Annonaceae antara lain senyawa alkaloid, antrakuinon, flavonoid, asetogenin, dan minyak atsiri yang berpotensi sebagai antikanker, antitumor, insektisida, antiradikal bebas, antioksidan dan antimikroba. (Hakim, 2001; Santos,2001; Wang, 2002). Penelitian terdahulu telah berhasil disolasi senyawa golongan terpen, steroid, lignan, flavonoid dan alkaloid dari kulit batang *Saccopetalum horsfieldii* Benn (Tanjung, 2005). Senyawa-senyawa golongan flavonoid dan alkaloid mempunyai aktivitas sebagai antiradikal bebas dan bersifat toksik terhadap *Artemia salina* yang merupakan praskrining uji antikanker.

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji senyawa flavonoid dan alkaloid yang terdapat pada kulit batang tumbuhan *Saccopetalum horsfieldii* Benn serta menentukan hubungan antara struktur molekul senyawa-senyawa flavonoid dengan aktivitas biologinya terhadap sel murin leukemia P-388. Pemisahan dan pemurnian senyawa flavonoid menggunakan metodologi yang lazim dalam bidang kimia organik bahan alam yang meliputi ekstraksi, dan kromatografi. Penentuan struktur senyawa akan ditetapkan berdasarkan spektroskopi, yaitu ultraviolet, inframerah dan resonansi magnetik inti-. Pengujian sifat sitotoksik senyawa-senyawa flavonoid hasil isolasi dilakukan terhadap sel murin leukemia P-388 dengan menggunakan metode pewarnaan MTT assay.

Penelitian dilakukan secara eksplorasi dan eksperimental. Penelitian eksplorasi dilakukan untuk mengisolasi senyawa flavonoid dan alkaloid serta menentukan struktur senyawa flavonoid dan alkaloid yang terkandung dalam kulit batang *Saccopetalum*

horsfieldii Benn. Isolasi senyawa flavonoid dilakukan sebagaimana lazimnya dalam bidang kimia organik bahan alam ekstraksi dan pemisahan. Ekstraksi senyawa flavonoid dan alkaloid menggunakan cara maserasi pada suhu kamar. Pemisahan crude ekstrak menggunakan metode kromatografi seperti kromatografi lapis tipis KLT, kolom vacum cair, kolom tekan, dan kromatografi radial. Senyawa flavonoid dan alkaloid hasil isolasi ditentukan struktur kimianya berdasarkan metode spektroskopi seperti spektroskopi ultraviolet (UV), inframerah (IR), dan resonansi magnet inti (1D dan 2D-RMI). Berdasarkan data hasil spektroskopi diketahui bahwa senyawa flavonoid dan alkaloid yang terdapat dalam kulit batang *Saccopetalum horsfieldii* Benn antara lain kuersetin 3,7-dimetileter, kuersetin 3,7,4'-trimetileter, rhamnositrin, liriodenin, dan aktinodapnin.



Uji aktivitas sifat toksisitas terhadap sel murine leukemia P-388, senyawa flavonoid memperlihatkan bahwa rhamnositrin > kuersetin 3,7-dimetileter > kuersetin 3,7,4'-trimetileter. Hal ini disebabkan dengan adanya penambahan gugus hidroksi pada C-3 akan menurunkan sifat sitotoksik pada senyawa turunan kuersetin. Adanya penambahan gugus metoksi pada senyawa kuersetin 3,7,4'-trimetileter menurunkan sifat sitotoksik dibandingkan senyawa kuersetin 3,7-dimetileter. Senyawa alkaloid liriodenin lebih aktif terhadap aktinodapnin dipengaruhi dengan adanya gugus karbonil pada senyawa liriodenin.

Senyawa-senyawa flavonoid dan alkaloid yang berhasil diisolasi dirankan melanjutkan uji aktivitas terhadap sel kanker yang lain pada tingkat molekuler atau seluler sehingga memberikan informasi yang lebih luas hubungan antara struktur senyawa flavonoid dan alkaloid dengan aktivitas antikanker yang terdapat pada *Saccopetalum horsfieldii* Benn.

Dibiayai oleh Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat
Direktorat Pendidikan Tinggi
Nomor : 319/SP2H/PP/DP₂M/III/2008
Tanggal 5 Maret 2008

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah swt. yang senantiasa memberikan petunjuk, bimbingan dan rahmat-Nya sehingga penelitian kami yang berjudul “ Senyawa Flavonoid dan Alkaloid Antikanker dari *Saccopetalum horsfieldii* Benn Sebagai Apoptosis dan Hubungan Struktur-Aktivitas Antikanker” dapat terselesaikan.

Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Universitas Airlangga yang telah memberi kesempatan dalam melaksanakan penelitian.

Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas penelitian.

Dr. Unang Supratman dari Jurusan Kimia Unpad, Bandung, Dr. L.B. Kardono, Dr. Hanafi dan Ahmad Darmawan dari Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Kimia, Serpong atas bantuan pengambilan data spektrum Resonansi Magnit Inti.

Prof. Dr. Euis Holisotan Hakim, Dr.Lia Dewi dan Nizar Happyana, S.Si., M.Sc. dari Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam, Departemen Kimia, ITB Bandung atas bantuan pengujian sel murin leukemia P388.

Rekan penelitian, serta semua pihak atas sumbangan pikiran dan dan bantuan yang telah diberikan.

Kami menyadari bahwa ini penelitian ini masih jauh dari kesempurnaan, akan tetapi kami berharap penelitian ini bermanfaat bagi dunia ilmu pengetahuan.

Surabaya, Juli 2009

Peneliti

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN DAN SUMMARY	iii
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Permasalahan	1
1.2. Rumusan Masalah	2
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1. Annonaceae	3
2.2. Kandungan Kimia Annonaceae	3
2.3. Kandungan Kimia <i>Saccopetalum</i>	7
2.4. Hubungan Struktur Antikanker Senyawa Kimia Annonaceae	9
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	16
3.1. Tujuan Penelitian	16
3.2. Manfaat Penelitian	16
BAB IV. METODE PENELITIAN	17
4.1. Tempat dan Waktu Penelitian	17
4.2. Bahan Penelitian	17
4.2.1. Bahan	17
4.2.2. Peralatan	18
4.3. Pelaksanaan Penelitian	18
4.3.1. Isolasi dan pemurnian senyawa	18

	flavonoid dan alkaloid	
	4.3.2. Spektroskopi senyawa-senyawa flavonoid dan alkaloid	19
	4.3.3. Uji toksisitas senyawa flavonoid terhadap sel murin leukemia P-388	19
BAB V.	HASIL DAN PEMBAHASAN	22
	5.1. Isolasi Senyawa Flavonoid dan Alkaloid	22
	5.2. Identifikasi Senyawa Kuersetin 3,7-dimetileter	23
	5.3. Identifikasi Senyawa Kuersetin 3,7,4'-trimetileter	25
	5.4. Identifikasi Senyawa Rhamnositrin	27
	5.5. Identifikasi Senyawa Liriodenin	28
	5.6. Identifikasi Senyawa Aktinodapnin	30
	5.4. Uji Sitotoksik Senyawa Flavonoid dan Alkaloid Terhadap Sel Murin Leukemia P-388	31
BAB VI.	KESIMPULAN DAN SARAN	33
	6.1. Kesimpulan	33
	6.2. Saran	34
	DAFTAR PUSTAKA	35
	LAMPIRAN	38

DAFTAR TABEL

	Hal
Tabel 1. Nilai EC ₅₀ sel kanker leukemia senyawa-senyawa flavonoid	13
Tabel 2. \bar{O}_H senyawa kuersetin 3,7-dimetileter dan kuersetin 3,7,4 -trimetileter	26
Tabel 3. \bar{O}_C senyawa kuersetin 3,7-dimetileter dan kuersetin 3,7,4 -trimetileter	26
Tabel 4. 1D dan 2D-RMI senyawa liriodenin hasil isolasi	29
Tabel 5. Nilai IC ₅₀ senyawa flavonoid dan alkaloid hasil isolasi	32

DAFTAR GAMBAR

	Hal
Gambar 1. Percobaan 2D-ROESY senyawa rhamnositrin	28
Gambar-2. Observasi morfologi SEM	32

DAFTAR LAMPIRAN

		Hal
Lampiran-1.	Spektrum ¹ H dan ¹³ C-RMI kuersetin 3,7-dimetileter	38
Lampiran-2.	Spektrum ¹ H dan ¹³ C-RMI kuersetin 3,7,4'-trimetileter	39
Lampiran-3.	Spektrum ¹ H-RMI rhamnositrin	40
Lampiran-4.	Spektrum ¹ H dan COSY liriodenin	41
Lampiran-5.	Spektrum ¹³ C-RMI dan spektrum massa liriodenin	42
Lampiran-6.	Spektrum ¹ H-RMI aktinodapnin	43

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Permasalahan

Kanker merupakan suatu penyakit yang ditandai dengan adanya kerusakan dan ketidak normalan gen mengatur pertumbuhan yang mengakibatkan mutasi gen. Di Indonesia, penyakit ini merupakan penyakit yang menduduki peringkat atas penyebab kematian setelah penyakit jantung.

Dalam rangka mendapatkan obat kanker yang efektif dan selektif sebagai usaha pengobatan secara kemoterapi menjadi sangat penting pada saat ini. Pada umumnya obat kanker yang berasal dari senyawa sintetik bekerja tidak selektif karena memiliki mekanisme kerja merusak DNA tidak hanya sel kanker tetapi juga sel normal disekitarnya. Senyawa taksol dan vinkristin merupakan senyawa alam yang banyak digunakan dalam terapi kanker saat ini tetapi mengingat persediaan tanaman yang memproduksi senyawa tersebut sangat terbatas maka perlu dicari senyawa alternatif dari tanaman yang lain.

Saccopetalum horsfieldii Benn merupakan salah satu tanaman endemik Indonesia termasuk dalam famili Annonaceae. Annonaceae merupakan salah satu famili tumbuhan menghasilkan senyawa kimia golongan alkaloid, antrakuinon, flavonoid, asetogenin, dan minyak atsiri yang berpotensi sebagai antikanker, antitumor, insektisida, antiradikal bebas, antioksidan dan antimikroba. (Hakim, 2001; Santos,2001; Wang, 2002). Penelitian mengenai kandungan senyawa kimia *Saccopetalum horsfieldii* Benn berdasarkan penelitian terdahulu mengandung senyawa golongan terpen, steroid, lignan, flavonoid dan alkaloid (Tanjung, 2005). Senyawa-senyawa golongan flavonoid dan alkaloid yang terdapat dalam *Saccopetalum horsfieldii* Benn mempunyai aktivitas sebagai antiradikal bebas dan bersifat toksik terhadap *Artemia salina* yang merupakan praskrining uji antikanker. Kajian kandungan kimia genus *Saccopetalum* merupakan rangkaian kegiatan penelitian bersinambung untuk mempelajari hubungan biosintesis senyawa yang terdapat dalam *Saccopetalum* ditinjau dari hubungan kemotaksonomi dan phylogenetik tanaman (Tanjung, 2008). Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi kandungan senyawa

flavonoid dan alkaloid yang terdapat dalam kulit batang *Saccopetalum horsfieldii* Benn serta mengkaji hubungan struktur-aktivitas sifat sitotoksik terhadap sel murin leukemia P-388. Penelitian ini menggunakan pendekatan dan metodologi penelitian yang lazim digunakan dalam penelitian kimia organik bahan alam. Isolasi kandungan senyawa flavonoid dari bahan tumbuhan dilakukan dengan cara ekstraksi menggunakan pelarut metanol pada suhu kamar. Ekstrak metanol selanjutnya dipartisi dengan pelarut heksan. Selanjutnya ekstrak methanol dipartisi dengan pelarut etilasetat setelah kandungan senyawa alkaloid terlebih dahulu dijadikan garam alkaloid. Garam alkaloid setelah penembahan basa diekstraksi dengan etilasetat untuk mendapatkan ekstrak total alkaloid. Ekstrak etilasetat dilakukan pemisahan dengan kolom vacum cair untuk mendapatkan fraksi-fraksi flavonoid. Hal yang sama terhadap ekstark total alkaloid dilakukan pemisahan dengan kromatografi vacuum cair. Fraksi-fraksi flavonoid dan alkaloid yang memberikan efek toksisitas terhadap sel murin leukemia P-388, selanjutnya dilakukan pemisahan dan pemurnian dengan kromatogarfi tekan dan kromatografi radial (kromatotron). Struktur kimia senyawa aktif flavonoid hasil isolasi ditentukan struktur molekulnya menggunakan metode spektroskopi seperti ultraviolet, inframerah dan resonansi magnit inti. Senyawa flavonoid dan alkaloid hasil isolasi ditentukan efek toksisitasnya terhadap sel murin leukemia P-388. Dari data IC_{50} senyawa flavonoid selanjutnya ditentukan gugus farmakofor/fungsi yang dapat meningkatkan efek toksisitas terhadap sel murin leukemia P-388.

1.2. PERUMUSAN MASALAH:

Penelitian ini dirancang untuk menjawab permasalahan di atas sebagai berikut:

1. Bagaimanakah struktur molekul senyawa-senyawa flavonoid dan alkaloid yang terdapat dalam kulit batang *Saccopetalum horsfieldii* Benn?
2. Apakah senyawa-senyawa flavonoid dan alkaloid tersebut mempunyai efek sitotoksik terhadap sel murin leukemia P-388?
3. Bagaimanakah hubungan struktur-aktivitas senyawa flavonoid dan alkaloid terhadap sel murin leukemia P-388?

BAB. II

TINJAUAN PUSTAKA

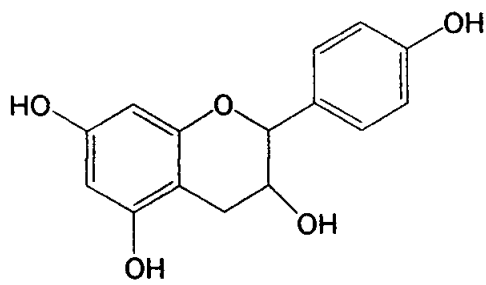
2.1. Annonaceae.

Annonaceae merupakan salah satu famili tumbuhan yang tersebar di daerah tropis dan subtropis. Keberadaan tumbuhan ini sangat melimpah di seluruh wilayah Indonesia. Spesies tumbuhan ini banyak dimanfaatkan masyarakat untuk berbagai keperluan, diantaranya sebagai bahan pangan, bahan insektisida, bahan bangunan dan bahan obat-obatan. Kandungan kimia yang terdapat pada famili ini antara lain terpenoid, steroid, asetogenin, flavonoid, alkaloid, lignan dan santon terprenelasi. Senyawa-senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh famili tanaman banyak memperlihatkan aktivitas yang menarik seperti antimikroba, antitumor, antikanker, antioksidan dan insektisida (Hakim, 2001).

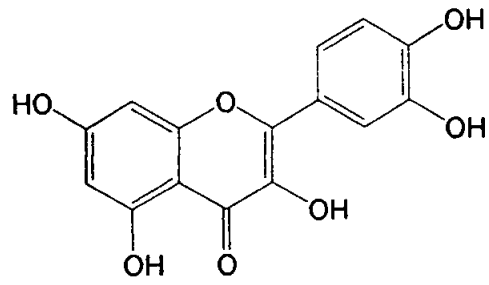
2.2. Kandungan Kimia Annonaceae

Kandungan senyawa kimia famili Annonaceae antara lain terpenoid, steroid, asetogenin, flavonoid, alkaloid, lignan dan santon (Hakim, 2001).

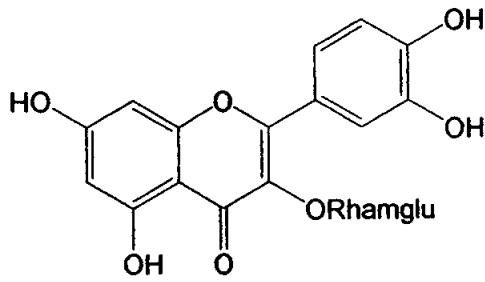
Senyawa flavonoid merupakan senyawa golongan fenolik yang terbesar ditemukan pada famili Annonaceae. Senyawa flavonoid mempunyai kerangka dasar $C_6-C_3-C_6$ dimana C_6-C_3 berasal dari jalur asam skimat sedangkan C_6 berasal dari jalur asetat malonat. Senyawa flavonoid famili Annonaceae selain flavonoid yang umum ditemukan pada famili tanaman yang lain tetapi juga ditemukan senyawa flavonoid dengan kerangka **C-benzilflavonoid** (Okorie, 1977). Senyawa katekin, kuersetin, kuersittrin, dan rutin merupakan jenis senyawa flavonoid yang mempunyai aktivitas antitumor, antikanker dan antioksidan (Cos, 1988; Cuendet, 1977).



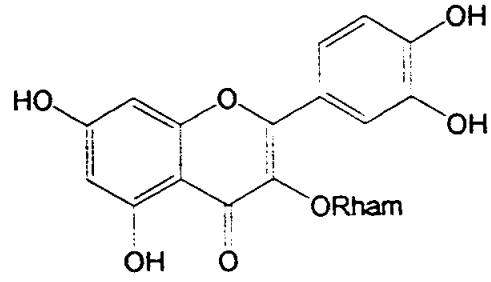
catekin



kuersetin

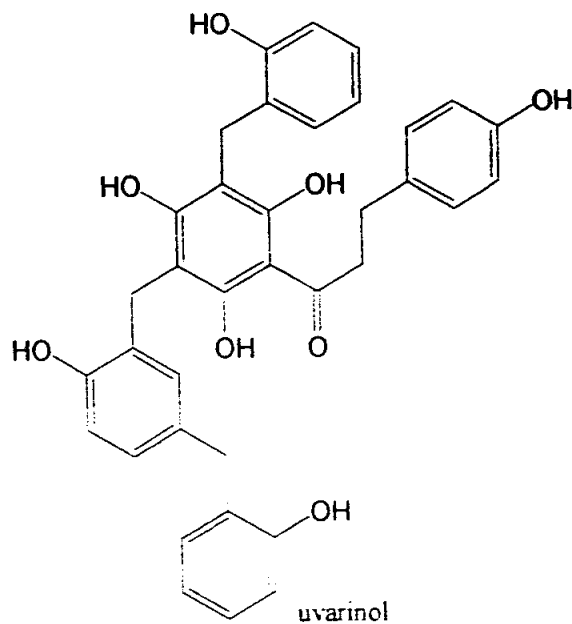
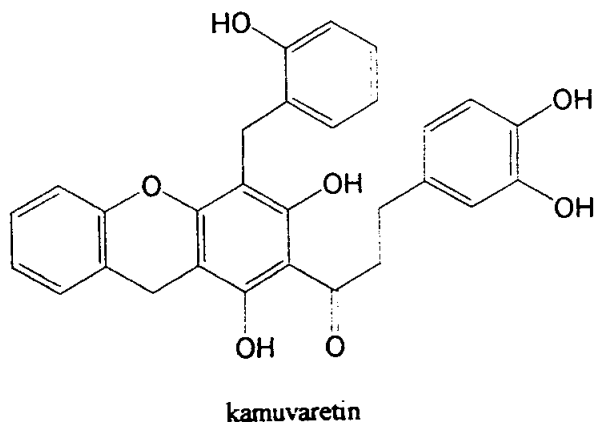
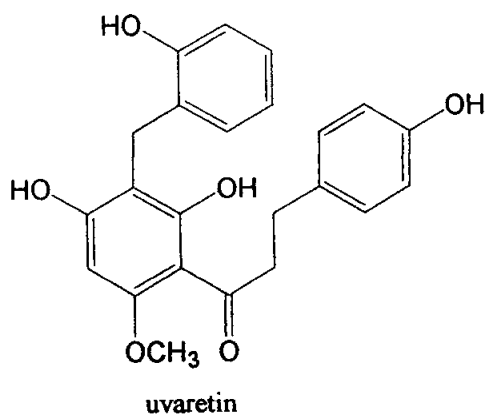


kuersitrin



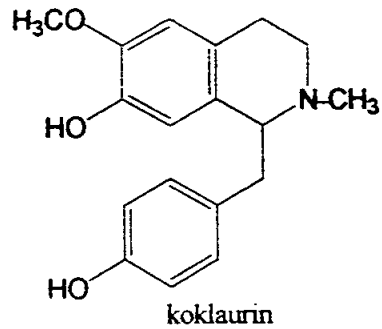
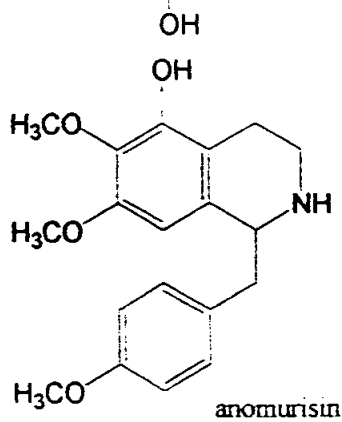
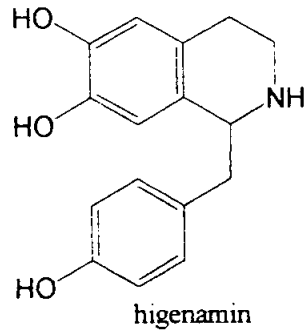
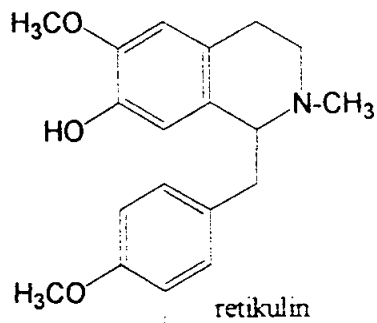
rutin

Senyawa C-benzilflavonoid yang ditemukan pada famili Annonaceae sering ditemukan pada genus *Uvaria*. Senyawa uvaretin berhasil dipisahkan dari *Uvaria angolensis* dan *Uvaria chamae* sedangkan kamuvaretin dan uvarinol ditemukan pada *Uvaria chamae* yang memperlihatkan aktivitas antikanker (Hakim, 2001; Okorie, 1977). Senyawa uvaretin dan kamuvaretin merupakan senyawa flavonoid jenis dihidrochalkon sedangkan uvarinol termasuk jenis flavanon.

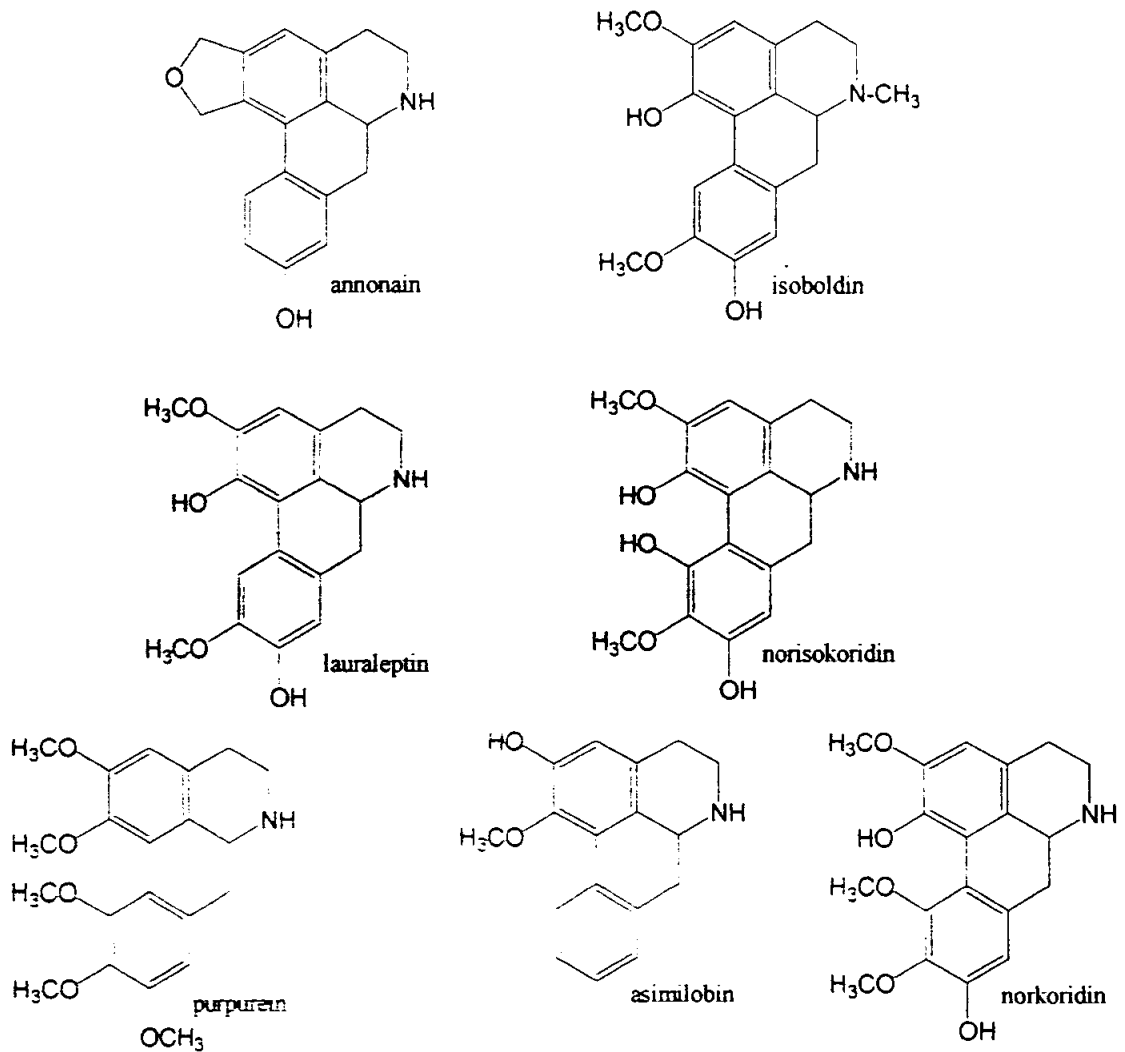


Senyawa alkaloid yang ditemukan pada famili Annonaceae merupakan senyawa derivat alkaloid benzylisokuinolin. Derivat alkaloid benzylisokuinolin antara lain aporfin, benzylisokuinolin, benziltetrahidroisokuinolin, oksoaporfin, fenantren, protoberberin dan tetrahydroberberin (Hakim, 2001).

Alkaloid jenis benziltetrahidroisokuinolin yang dipisahkan dari famili Annonaceae antara lain retikulin, higenamin, anomurisin dan koklaurin yang ditemukan pada genus *Annona* dan *Xylophia* (Jhons, 1968).



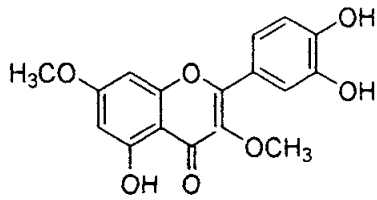
Senyawa alkaloid jenis aporfin merupakan alkaloid utama yang ditemukan pada famili Annonaceae. Senyawa alkaloid jenis aporfin merupakan senyawa yang memperlihatkan aktivitas insektisida pada famili Annonaceae selain senyawa golongan asetogenin. Senyawa annonain isoboldin, lauraleptin, norisokoridin, purperein, asimilobin, dan norkoridin ditemukan pada spesies *Annona squamosa*, *Annona purpurea*, *Xylopia glabra* dan *Xylopia danguyella* (Hakim, 2001; Johns, 1968; Wu, 1989).



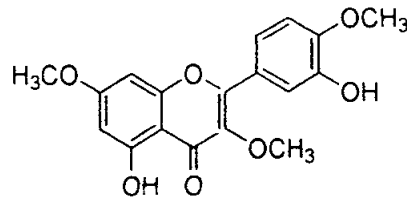
2.3. Kandungan Kimia *Saccopetalum*

Kajian senyawa metabolit sekunder dalam genus *Saccopetalum* antara lain golongan flavonoid, alkaloid, lignan, steroid dan terpenoid (Kristanti, 2004; Tanjung 2008; 2005). Senyawa golongan flavonoid yang diisolasi dari *Saccopetalum heterophylla* yakni apigenin dan luteolin yang bersifat sitotoksik terhadap sel murin leukemia P-388 (Tanjung, 2008) sedangkan *Saccopetalum harsfieldii* Benn antara lain golongan flavonoid antara lain kuersetin 3,7-dimetileter, kuersetin 3,7,4'-trimetileter, 5,3,4'-tetrahidrosi-flavon, combretol dan kamuvaretin, sedangkan senyawa alkaloid antara lain armapavin, liriodenin dan laudanosin serta senyawa lignan yakni 2-hidroksi-1,4-difenil-but-3-en-1-on. Senyawa kuersetin 3,7-dimetileter, kuersetin 3,7,4'-trimetileter,

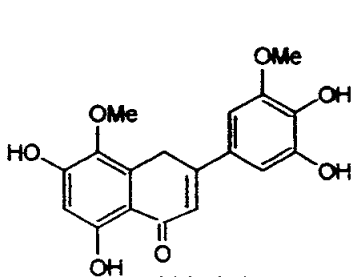
5,3',4'-tetrahidroksi-flavon, dan combretol memperlihatkan aktivitas sebagai radikal bebas scavengers dan inhibitor *xanthine oxidase* (Kristanti, 2004; Tanjung 2003; 2004).



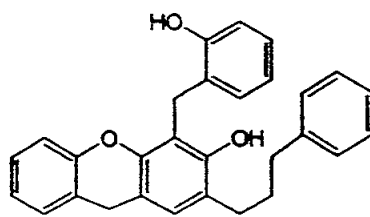
kuersetin-3,7-dimetiler



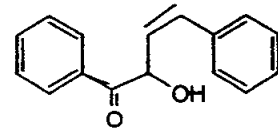
kuersetin-3,7,4'-trimetiler



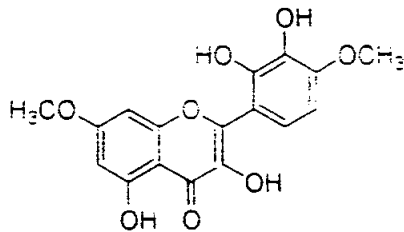
5,6,3',4'-tetrahidroksi-
8,2'-dimetoksiflavon



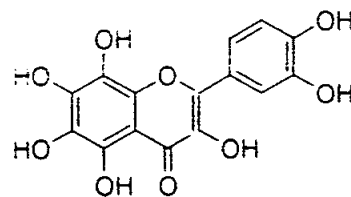
kamuvaretin



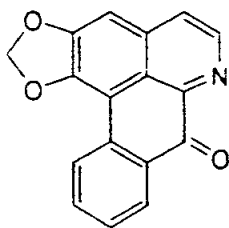
2-hidroksi-1,4-difenil-
but-3-en-1-on



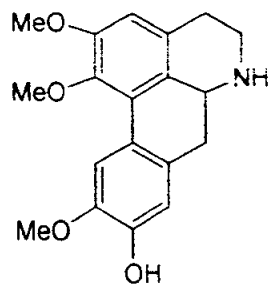
3,5,2',3'-tetrahidroksi-
7,4-dimetoksiflavon



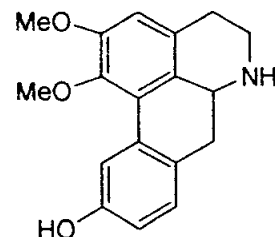
3,5,6,7,8,3',4'-heptahidroksiflavon
(combretol)



liriidenin



norlaudanisin



norarmepavin

Senyawa golongan novel γ -laktone terdapat pada *Saccopetalum prolificum* antara lain saccopetrin A, saccopetrin B, saccopetrin C dan saccopetrin D yang aktif terhadap sel kanker KB dan HCT-8 (Wang, 2002).

2.4. Hubungan Struktur-Aktivitas Antikanker Senyawa Kimia Annonaceae

Kanker merupakan salah satu ancaman dalam dunia kesehatan. Penyakit ini dapat menyebabkan kematian dan menempati urutan kedua setelah penyakit kardiovaskuler. Di Indonesia, ditenggarai angka kematian akibat kanker meningkat tiga kali lipat dalam dua dasawarsa terakhir.

Pada dasarnya kanker merupakan penyakit genetik yang berhubungan dengan perubahan di dalam sel yang diakibatkan pengaruh lingkungan seperti virus, senyawa karsinogen, radiasi dan rangsangan fisik. Virus dalam tubuh dapat mengacaukan sistem penggandaan sel yang berlebihan. Faktor genetik dan kesalahan dalam replikasi gen dapat memicu timbulnya kanker akibat teraktivasinya pro-onkogen menjadi onkogen (Nayak, 1999; Suryohudoyo, 2004)

Proses pembentukan kanker terdiri empat tahap. Pada tahap inisiasi terjadi kerusakan DNA atau mutasi yang mengatur penggandaan sel. Tahap promosi terjadi peningkatan penggandaan sel yang abnormal akibat proses inisiasi. Munculnya sel-sel kanker ganas yang diikuti perubahan genetik yang nyata menandai perkembangan tahap progresi. Pada tahap metastasis (stadium empat), sel kanker melakukan ekspansi ke jaringan lain pembuluh darah. Sel ekspansif akan membentuk kanker sekunder di jaringan yang ditulari.

Secara teoritis timbulnya kanker pada umumnya terjadi oleh senyawa-senyawa yang berinteraksi dengan DNA sehingga terjadi mutasi atau senyawa-senyawa yang membutuhkan aktivitas metabolik terlebih dahulu. Kedua golongan senyawa tersebut membentuk senyawa intermediet yang akan menghasilkan alkilasi atau aselasi DNA sehingga menyebabkan kesalahan pasangan basa DNA sehingga waktu replikasi akan terjadi perubahan urutan basa atau terjadi kesalahan pembacaan informasi genetik dan mengakibatkan terjadinya mutasi. Mutasi DNA dapat memicu perkembangan neoplastik yang menghasilkan sel tumor atau kanker (Jagetia, 2006; Nayak, 1999; Rahman, 2001).

Pengamatan empirik di Indonesia menunjukkan bahwa tumbuhan obat masih diyakini sebagai alternatif dalam pengobatan kanker. Hal ini mengingat obat kanker yang beredar di pasaran harganya relatif mahal dan banyak bersifat mutagen. Senyawa antikanker yang berasal dari tumbuhan dan telah banyak dimanfaatkan diantaranya

senyawa vinkristin dan vinblastin dari *Vinca roseus* dan taksol dari *Taxus brevifolia* (Jagetia, 2006, Tabata, 2005). Taksol sebanyak 1kg diperlukan 12.500 kg kulit kering (sekitar 2500 pohon) untuk mendapatkan senyawa tersebut. Jika 36 kg taksol yang diperlukan untuk satu tahun maka diperlukan 90.000/tahun. Selanjutnya dengan adanya pengesahan Food and Drug Amerika FDA maka kebutuhan taksol untuk pengobatan kanker maka diperkirakan akan meningkat menjadi tiga kali. Mengingat persediaan tanaman sangat terbatas maka perlu alternatif dari tanaman yang lain. Hal ini mengingat sintesis taksol sampai saat ini belum bisa menjawab masalah tersebut demikian juga menggunakan kultur jaringan.

Pada dasarnya strategi pengembangan senyawa alam untuk mendapatkan obat kanker yang aman dan efektif meliputi uji senyawa aktif pada kultur sel kanker, uji senyawa aktif pada tingkat molekuler (DNA break) dan mekanisme aktivitas antikanker senyawa aktif secara *in vivo* dengan menggunakan hewan percobaan. Mekanisme aktivitas senyawa alam sebagai antikanker antara lain DNA alkilasi, inhibisi DNA, Inhibisi sintesis protein, DNA topoisomerase, inhibisi lipoksigenase dan mekanisme imun (Ancuceanu, 2004).

Teknik *Quantitative Structure-Activity Relationship* QSAR merupakan teknik pengembangan korelasi kereaktifan molekul antara substituen dalam senyawa antara lain bentuk aktivitas, frekuensi aktivitas biologis, dan sifat fisikokimia.

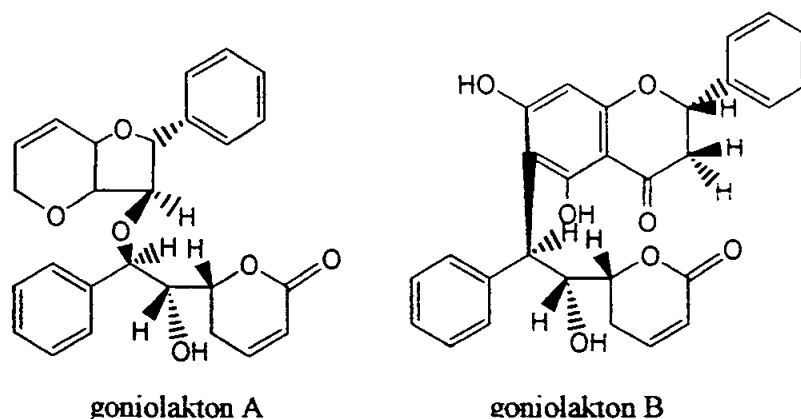
Sifat fisikokimia dalam QSAR diklassifikasikan dalam tiga type antara lain sifat elektronik, sterik dan hidrofobik. Parameter-parameter tersebut dibuat persamaan fungsi matematika F dalam program komputer PC, seperti multiple linear regression (MLR) sehingga diperoleh persamaan matematika sebagai berikut,

$$\text{Aktivitas Biologis} = F(\text{sifat fisikokimia})$$

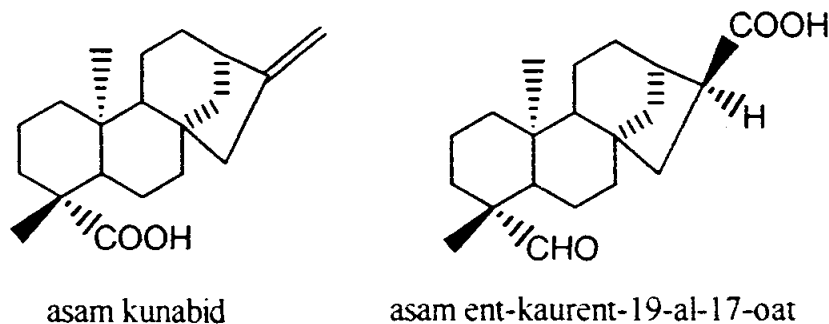
Aktivitas biologis suatu senyawa pada umumnya dinyatakan dalam bentuk IC_{50} dan EC_{50} . Dengan demikian maka akan diperoleh suatu gambaran aktivitas suatu senyawa antara teori dan percobaan.

Enam senyawa baru golongan stilipiron, goniolakton A-F dari *Goniothalamus cheliensis* (Annonaceae). Goniolakton B memperlihatkan aktivitas antikanker terhadap *cell line A2780 human epithelial carcinoma*, HCT-8 *human eleocecal carcinoma*, dan KB *human epidermoid carcinoma* sedangkan goniolakton A tidak aktif. Hubungan

struktur-aktivitas antikanker senyawa goniolakton A dan B dibedakan pada atom C-8 laktonnya (Wang, Si, 2002).



Dua senyawa golongan diterpen baru yakni asam kunabid dan asam ent-kauren-19-al-17-oat dari *Annona glabra* Linn. (Annonaceae) juga memperlihatkan aktivitas antikanker dalam kultur sel *Human Liver Cancer* (HLC) dimana asam ent-kauren-19-al-17-oat mempunyai sifat toksisitas yang lebih tinggi daripada asam kunabid. Gugus fungsi yang berperan terhadap aktivitas antikanker antara lain gugus asam karboksilat, aldehid, dan alkena dalam hubungan struktur-aktivitas kedua senyawa diterpen (Zhang, 2004).

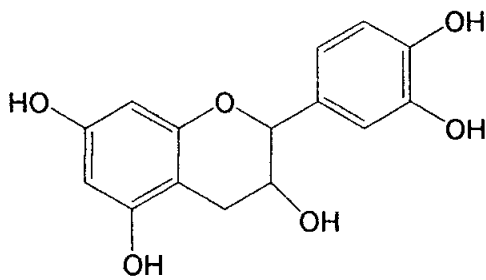


Senyawa flavonoid yang mempunyai aktivitas sebagai antikanker antara lain seperti katekin, epikatekin, kuersetin, luteolin, dan kuersetin. Korelasi hubungan **Struktur-Aktivitas** senyawa flavonoid terhadap sel leukemia manusia dapat dilihat pada Tabel-1. Gugus fungsi hidroksi OH yang terikat pada posisi atom C-5 yang membentuk ikatan hydrogen dengan gugus karbonil C=O pada C-4 aktivitas antikanker akan lebih tinggi daripada senyawa flavonoid yang tidak mempunyai gugus karbonil C=O pada C-4, misalnya taksifolin vs katekin. Adanya ikatan rangkap C=C pada posisi C-2 dan C-3 akan

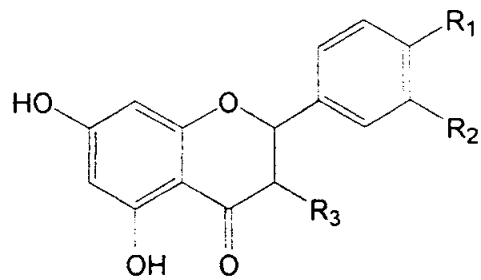
lebih meningkatkan aktivitas antikanker dibandingkan yang tidak mempunyai ikatan rangkap C=C pada posisi C-2 dan C-3, misalnya luteolin vs eriodiktiol, kuersetin vs taksifolin dan apigenin vs naringenin. Aktivitas antikanker akan lebih tinggi jika ada gugus hidroksi OH atau substituen prenil yang terikat pada posisi atom C-3 dibandingkan yang tidak ada gugus hidroksi pada C-3, misalnya kaempferol vs apigenin, kuersetin vs luteolin dan taksifolin vs eriodiktiol. Jumlah gugus hidroksi OH yang terikat pada cincin aromatik senyawa flavonoid juga mempengaruhi aktivitas antikanker. Senyawa flavonoid yang jumlah hidroksinya 2 (dua) akan mempunyai aktivitas antikanker yang lebih rendah dibandingkan yang gugus hidroksinya 3 (tiga) atau 4 (empat) tetapi senyawa flavonoid yang jumlah hidroksinya 5 (lima) juga lebih rendah dibandingkan yang gugus hidroksinya 3 (tiga) atau 4 (empat), kirsimaritin, krisin dan 7-OMe baikelin mewakili senyawa flavonoid yang jumlah OH-nya dua, apigenin, hispidulin, baikelin dan isoramnetin mewakili senyawa flavonoid yang gugus OH-nya tiga sedangkan senyawa luteolin, kaempferol dan skutellarein mewakili senyawa flavonoid yang gugus OH-nya empat serta senyawa kuersetin, mirisetin dan morin mewakili senyawa flavonoid yang gugus OH-nya lima. Letak gugus hidroksi pada cincin B senyawa flavonoid juga mempengaruhi aktivitas antikanker. Posisi orto dihidroksi di cincin B lebih tinggi aktivitasnya daripada meta dihidroksi, misalnya kuersetin vs morin dimana aktivitas kuersetin tiga kali lebih besar daripada morin. Adanya gugus metoksi OMe dan gugus glukonidasi pada cincin A senyawa flavonoid umumnya pada posisi C-7 juga meningkatkan aktivitas antikanker dibandingkan yang tidak mempunyai substituen atau ada gugus hidroksi pada C-7, misalnya 7-metoksi baikelin vs baikelin, kirsimaritin vs hispidulin, hispidulin vs skutellarein, isoramnetin vs kuersetin, baikelin glukoronida vs baikelin dan skullarein glukoronida vs skullarein. Gugus-gugus fungsi tersebut merupakan gugus aktif essential untuk aktivitas sebagai antikanker maupun antioksidan. Aktivitas senyawa flavonoid selanjutnya dapat diklasifikasikan berdasarkan jenis flavonoid kemudian pengaruh substituen gugus hidrofilik, hidrofobik, lipofilik dan faktor elektronik yang mempengaruhi tinggi atau tidaknya sifat aktivitas biologis senyawa flavonoid (Cos, 1998. Lin, 2002, Perruchon, 2004; Plochmann, 2007).

Tabel-1. Nilai EC₅₀ senyawa-senyawa flavonoid

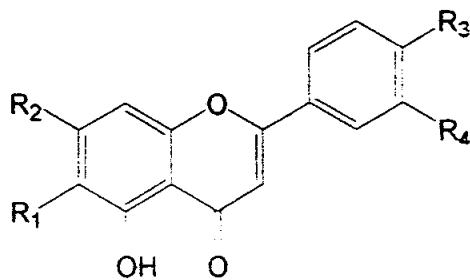
Senyawa	EC ₅₀ μ M (24 jam)	EC ₅₀ μ M (48 jam)	Peningkatan toksisitas EC ₂₄ /EC ₄₈
Skullarein-7-glukoronida	20,5	nd	-
Kirsimaritin	66,8	44,4	1,5
Apigenin	72,7	27,0	2,7
Luteolin	78,1	18,6	4,2
Krisin	84,3	49,1	1,7
7-metoksi baikalein	91,0	54,3	1,7
Isoramnetin	116,8	nd	-
Baikalein-7-glukoronida	137,0	nd	-
Hispidulin	153,1	62,7	2,4
Kaempferol	163,1	46,4	3,5
Baikalein	213,3	48,2	4,4
Eriodiktiol	226,2	34,1	6,6
Mirisetin	349,3	202,6	1,7
Kuersetin	354,4	83,3	4,3
Skullarein	501,9	176,0	2,9
Naringenin	617,7	131,6	4,7
Morin	680,3	230,2	3,0
Taksifolin	2247	65,9	34,1
Katekin	4410	1834	2,4



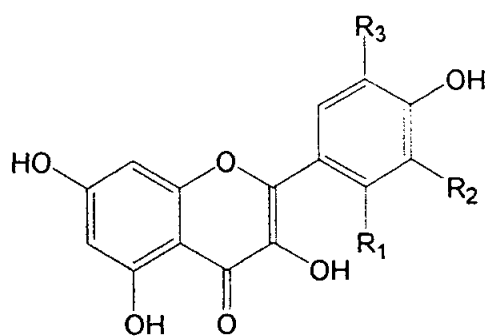
catekin



- naringenin : $R_1=R_3=OH, R_2=H$
 eridiktiol : $R_1=R_2=OH, R_3=H$
 taksifolin : $R_1=R_2=R_3=OH$



- krisin : $R_1=R_3=R_4=H, R_2=OH$
 apigenin : $R_1=R_4=H, R_2=R_3=OH$
 luteolin : $R_1=H, R_2=R_3=R_4=OH$
 baikalein : $R_1=R_2=OH, R_3=R_4=H$
 skutellarein : $R_1=R_2=R_3=OH, R_4=H$
 hispidulin : $R_1=OCH_3, R_2=R_3=OH, R_4=H$
 kirsimaritin : $R_1=R_2=OCH_3, R_3=OH, R_4=H$
 7-Ome baikalein : $R_1=OH, R_2=OCH_3, R_3=R_4=H$
 baikalein-7-glukoronida : $R_1=OH, R_2=glukoronida, R_3=R_4=H$
 skullarein-7-glukoronida : $R_1=R_3=OH, R_2=glukoronida, R_4=H$



kaempferol : $R_1=R_2,R_3= H$
 morin : $R_1=OCH_3, R_2= R_3=H$
 kuersetin : $R_2=OH, R_1= R_3=H$
 isoramnetin : $R_2=OCH_3, R_1=R_3=H$
 mirisetin : $R_2=R_3=OH, R_1=H$

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian

Penelitian bertujuan untuk:

1. Menentukan struktur molekul senyawa flavonoid dan alkaloid yang terdapat pada kulit batang *Saccopetalum horsfieldii* Benn.
2. Menentukan efek sitotoksik senyawa flavonoid dan alkaloid terhadap sel murin leukemia P-388,
3. Menentukan hubungan struktur-aktivitas senyawa flavonoid dan alkaloid terhadap sel murin leukemia P-388 berdasarkan unit farmakofor/gugus fungsi senyawa flavonoid.

3.2. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk memberikan konfirmasi ilmiah korelasi hubungan struktur-aktivitas senyawa flavonoid dan alkaloid yang terdapat pada kulit batang *Saccopetalum horsfieldii* Benn terhadap sel murin leukemia P-388 sehingga dapat dijadikan model untuk ditingkatkan uji aktivitas antikanker ketinggian molekuler atau seluler yang lebih spesifik dari tumbuhan endemik Indonesia.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Pemisahan dan pemurnian senyawa metabolit sekkunder yang tersimpan dalam kulit batang *Saccopetalum horsfieldii* Benn dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia, Fsaintek, Universitas Airlangga pada bulan April-Desember 2008.

Pengambilan data spektrum resonansi magnit inti RMI dilakukan pada Laboratorium Kimia Instrumentasi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia LIPI-Kimia, Serpong, Banten.

Pengujian aktivitas sitotoksik terhadap sel murin leukemia P-388 dilakukan di Laboratorium Kimia Bahan Alam, Kimia Organik, Departemenn Kimia, Institut Teknologi Bandung ITB, Bandung.

4.2. Bahan Penelitian

4.2.1. Bahan

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian berupa kulit batang *Saccopetalum horsfieldii* Benn. Bahan tanaman diperoleh dari Kebun Raya Purwodadi, Pasuruan dan diidentifikasi di Laboratorium Herbarium, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia LIPI-Biologi, Cibinong, Bogor. Pelarut yang digunakan untuk keperluan ekstraksi dan isolasi adalah pelarut berkualitas teknis yang telah diredestilasi sedangkan untuk keperluan pemurnian dan pengukuran spektroskopi digunakan bahan yang berkualitas pro analisa.

Bahan kimia yang digunakan dalam isolasi dan pemurnian antara lain silika gel, plat kromatografi lapis tipis KLT, pereaksi serum sulfat CeSO_4 , heksan, metanol, etilasetat, kloroform, aluminium klorida AlCl_3 , asam klorida HCl , dan natrium asetat NaOAc , kalium bromide KBr dan aseton- d_6 .

Bahan yang digunakan dalam penentuan uji aktivitas antikanker antara lain sel murin leukemia P-388, media kultur RPMI-1640, fetal bovine serum FBS, kanamisin

sulfat, larutan buffer asam posfat PBS, trypan blue, dan pereaksi warna [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromida] MTT.

4.2.2. Peralatan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain rotavapor vakum, kolom kromatografi, Spektrometer UV-Vis merk Beckman DU-7500, FTIR merk Shimadzu 5300 dan spektrometer RMI merk JEOL yang bekerja pada 500MHz.

Peralatan yang digunakan untuk keperluan bioassay antara lain tabung nitrogen cair (tabung Dewar), incubator CO₂, autoclave, freezer -80°C, mikro plate reader, laminar flow dan mikroskop.

4.3. Pelaksanaan Penelitian

4.3.1. Isolasi dan pemurnian senyawa flavonoid dan alkaloid

Serbuk kulit batang *Saccopetalum horsfieldii* Benn sebanyak 3 kg direndam dengan metanol pada suhu kamar dengan cara maserasi sebanyak dua kali, Ekstrak metanol yang diperoleh diuapkan pelarutnya sampai volumenya 500 ml dengan menggunakan alat penguap tekanan rendah. Ekstrak metanol tersebut dipartisi dengan pelarut heksan untuk memisahkan senyawa-senyawa yang bersifat non polar. Ekstrak metanol selanjutnya ditambahkan asam sitrat 5% (pH 3-4), larutan asam tersebut dipartisi dengan etilasetat untuk memisahkan senyawa-senyawa golongan flavonoid serta golongan fenolik dari fasa asam. Selanjutnya fasa asam ditambahkan basa ammonia (pH 8-9) untuk mengubah garam alkaloid menjadi alkaloid bebas dan dilakukan ekstraksi dengan etilasetat untuk mendapatkan crude alkaloid total.

Crude ekstrak etilasetat (flavonoid dan alkaloid) selanjutnya dilakukan pemisahan dengan kromatografi vakum cair dengan menggunakan campuran heksan-etilasetat yang kepolarannya dinaikkan secara gradien yang menghasilkan fraksi-fraksi. Fraksi-fraksi yang mempunyai sifat sitotoksik terhadap sel murine leukemia P388 selanjutnya dilakukan pemurnian dengan kromatografi tekan atau kromatografi radial (kromatotron)..

Fraksi-fraksi senyawa golongan flavonoid yang bersifat sitotoksik terhadap sel murin leukemia P-388 antara lain kuersetin 3,7-dimetileter, kuersetin 3,7,4'-trimetileter, dan ramnositrin sedangkan golongan alkaloid antara lain liriodenin, dan aktinodapnin.

Untuk menghitung jumlah kematian sel kanker P-388 (sifat apoptosis) dilakukan dengan menggunakan metode MTT melalui pengambilan SEM (scanning elektron misroskopik)

4.3.2. Spektroskopi senyawa-senyawa flavonoid

Penentuan struktur kedua senyawa flavonoid hasil isolasi dilakukan dengan penggabungan analisis spektroskopi antara lain spektroskopi ultraviolet, inframerah dan resonansi magnet inti.

Serapan panjang gelombang maksimum senyawa flavonoid dan alkaloid hasil isolasi dalam metanol diukur dengan alat spectrometer ultraviolet. Serapan panjang gelombang maksimum senyawa flavonoid sangat khas tergantung jenis flavonoidnya. Posisi substituen yang terikat dalam senyawa flavonoid dapat ditentukan menggunakan pereaksi geser yakni dengan penambahan pereaksi aluminium klorida $AlCl_3$, $AlCl_3$ + asam klorida HCl dan natrium asetat NaOAc. Serapan panjang gelombang maksimum senyawa alkaloid dalam methanol sangat khas tergantung jenis alkaloidnya. Efek batokromik dilakukan dengan penambahan basa NaOH.

Identifikasi gugus fungsi senyawa flavonoid dan alkaloid diukur dengan alat spectrometer inframerah dengan mengamati bilangan gelombang yang dihasilkan. Gugus-gugus fungsi senyawa flavonoid sangat khas untuk masing-masing gugus fungsi. Sebelum pengukuran terlebih dahulu senyawa flavonoid dicampur dengan kalium bromide KBr kemudian dibuat menjadi pellet KBr selanjutnya diukur bilangan gelombang dari masing-masing senyawa.

Pola dan posisi proton senyawa flavonoid dan alkaloid hasil isolasi ditentukan dengan alat spectrometer resonansi magnet inti. Senyawa flavonoid dan alkaloid terlebih dahulu dilarutkan dengan aseton- d_6 dalam pipa kapiler selanjutnya dalam medan magnet dan ditentukan shimming proton agar sinyal proton senyawa flavonoid dan alkaloid hasil isolasi optimal.

4.3.3. Uji toksisitas senyawa flavonoid terhadap sel murin leukemia P-388

Uji aktivitas antikanker senyawa flavonoid hasil isolasi terhadap sel murin leukemia P-388 terlebih dahulu dilakukan persiapan antara lain pembuatan stok sel,

melarutkan sel, subkultur dan protocol uji MTT (Alley,1988; Rahman, 2001). Tahapan uji toksisitas terhadap sel murin leukemia P-388 adalah sebagai berikut,

A. Pembuatan stok sel

Sel murin leukemia P-388 dalam medium RPMI 1640 dengan konsentrasi 5×10^6 sel/ml dari labu kultur dimasukkan ke dalam tabung sentrifuse 15 ml kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1200-1300 rpm selama lima menit pada suhu kamar. Supernatan dipindahkan dengan pipet Pasteur steril. Endapan hasil sentifuse kemudian ditambahkan 1 ml fetal bovine serum FBS dan 100 μ l DMSO perlahan-lahan menggunakan pipet Pasteur steril kemudian dipindahkan ke dalam tabung 2 ml dan mulut tabung ditutup dengan parafilm dan disimpan dalam freezer pada suhu -80°C semalam. Larutan stok sel dipindahkan ke dalam tabung Dewar dan stok sel tersebut tahan dalam beberapa tahun.

B. Suspensi sel

Stok sel di atas yang membeku dilarutkan dalam waterbath pada suhu 37°C . Larutan sel dipindahkan dalam tabung sentrifuse 15 ml dan ditambahkan 10 ml larutan medium RPMI 1640 kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1200-1300 rpm selama lima menit pada suhu kamar dan supernatan dipisahkan dari endapan menggunakan pipet Pasteur steril. Selanjutnya dalam labu kultur ditambahkan 9 ml medium RPMI 1640 dan pellet sel yang telah diencerkan dengan sedikit medium yang sama kemudian disimpan dalam incubator CO_2 dengan tutup yang dilonggarkan. Pertumbuhan sel dapat diamati dengan mikroskop setelah semalam. Sel yang pertumbuhannya dapat digunakan untuk uji atau subkultur lebih lanjut.

C, Subkultur

Larutan medium RPMI 1640 sebanyak 9 ml masing-masingnya dalam tiga buah labu kultur 25 ml. Sel yang pertumbuhannya paling baik yang diinkubasi dalam incubator CO_2 dimasukkan ke dalam ketiga labu kultur masing-masing satu, dua dan empat tetes larutan sel menggunakan pipet bengkok steril kemudian disimpan dalam incubator CO_2 . Subkultur ini bisa dilakukan setelah dua atau tiga hari.

D. Protokol MTT assay

1. Hari ke-0, Inokulasi sel

Sel dengan pertumbuhan pada fase logaritma, larutan sel dibuat sekitar 3×10^5 ml/sel kemudian diinokulasi dalam plat mikro 96 lubang dasar rata dan kultivasi dilakukan dalam inkubator CO₂.

2. Hari ke-1, Penambahan sampel

Senyawa flavonoid hasil isolasi dilarutkan dalam dimetil sulfoksida DMSO. Pengenceran larutan uji dilakukan menggunakan larutan buffer asam posfat PBS. Larutan uji dengan berbagai konsentrasi ditambahkan dalam sel dalam plat mikro, kemudian dikocok dengan plat mikro mixer dan disimpan kembali dalam incubator CO₂ selama 48 jam.

3. Hari ke-2, Penambahan pereaksi MTT dan *stop solution*

Penambahan pereaksi [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromida] MTT dilakukan setelah 48 jam dari penambahan larutan uji. selanjutnya kemudian dikocok dengan plat mikro mixer selama dua menit dan disimpan kembali dalam incubator CO₂ Empat jam kemudian ditambahkan *stop solution* dan dikocok dengan baik sehingga tidak menimbulkan banyak busa yang dapat mengganggu dalam pengamatan dibawah mikroskop. Larutan uji disimpan kembali dalam incubator CO₂ selama 24 jam.

4. Hari ke-3, Pengukuran *optical density*

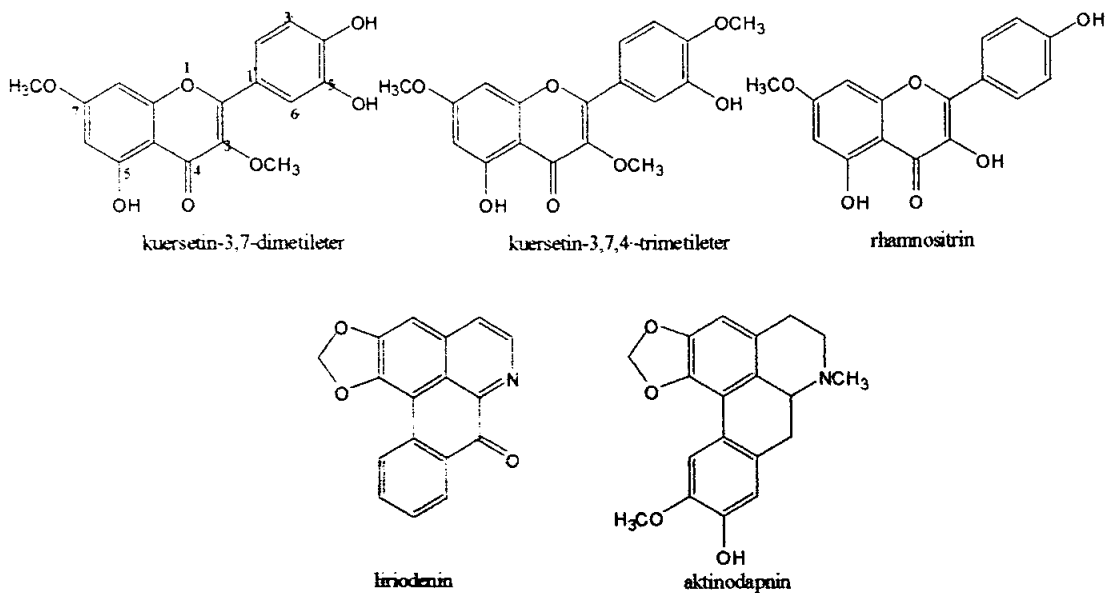
Pengukuran *optical density* O.D. ditentukan mikro plat *reader* setelah 24 jam penambahan *stop solution*. Hasil pengukuran O.D. larutan uji pada daerah panjang gelombang 550 nm dan 700 nm maka O.D. blanko dapat ditentukan kemudian data pengukuran O.D. dimasukkan dalam program Cricket untuk menghitung nilai IC₅₀. Penghitungan apoptosis dilakukan setelah penambahan reaksi MTT kemudian dilakukan pengukuran SEM (Scanning Elektron Mikroskop).

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Isolasi Senyawa Flavonoid dan Alkaloid

Bahan serbuk kering kulit batang *Saccopetalum horsfieldii* Benn sebanyak 3 kg direndam dengan pelarut metanol pada suhu kamar sebanyak dua kali. Ekstrak metanol selanjutnya dipartisi dengan pelarut n-heksan untuk menghilangkan senyawa-senyawa non polar yang mengganggu dalam pemisahan. Ekstrak metanol selanjutnya ditambahkan asam sitrat 5% (pH 3-4) untuk menggaramkan senyawa alkaloid yang tidak larut dalam pelarut organik. Larutan asam dipartisi dengan etilasetat, dimana ekstrak etilasetat mengandung senyawa-senyawa golongan flavonoid. Fasa asam selanjutnya setelah penambahan basa NH_4OH (pH 8-9) guna membebaskan garam alkaloid menjadi alkaloid bebas, selanjutnya dipartisi dengan etilasetat untuk memperoleh crude alkaloid total. Ekstrak etilasetat tersebut (flavonoid atau alkaloid) dilakukan pemisahan dan pemurnian. Senyawa flavonoid dan alkaloid yang diisolasi dilakukan pemisahan dengan kromatografi vakum cair yang dipandu dengan bioassay dengan pengujian sel murin leukemia P-388. Fraksi aktif selanjutnya dilakukan pemurnian dengan kromatografi kolom tekan dan kromatografi radial (kromatotron). Senyawa flavonoid yang bersifat sitotoksik terhadap sel murin leukemia P-388 antara lain kuersetin 3,7-dimetileter, kuersetin 3,7,4'-trimetileter, dan ramnositrin sedangkan golongan alkaloid antara lain liriodenin, dan aktinodapnin. Senyawa kuersetin 3,7-dimetileter, kuersetin 3,7,4'-trimetileter, dan ramnositrin merupakan senyawa turunan flavonol, senyawa liriodenin merupakan golongan oksoaporfin, sedangkan aktinodapnin merupakan turunan aporfin.



5.2. Identifikasi Senyawa kuersetin 3,7-dimetileter

Senyawa kuersetin 3,7-dimetileter merupakan senyawa flavonoid jenis flavonol, berwujud kristal jarum kuning muda, t.l. 224-226°C (Wang, 1989, : 222-223°C).

Spektrum ultraviolet senyawa 3,7-dimetileter dalam metanol memberikan panjang gelombang λ_{maks} 257 dan 359 nm, puncak serapan pada λ_{maks} 257 nm merupakan puncak benzoil dari sistem senyawa flavonoid sedangkan pada λ_{maks} 359 nm merupakan puncak serapan sinamoil dari sistem senyawa flavonoid turunan flavon atau flavonol (Andersen, 2006; Harborne, 1982). Efek batokromik senyawa flavonoid hasil isolasi ditentukan dengan pereaksi geser seperti $AlCl_3$, $AlCl_3 + HCl$ dan $NaOAc$ yang memberikan efek penambahan panjang gelombang. Efek batokromik dengan pereaksi geser $AlCl_3$ memberikan pergeseran pada λ_{maks} 413 nm yang khas dari senyawa flavonoid yang mempunyai gugus karbonil $C=O$ pada posisi C-4 dan gugus hidroksi OH pada posisi C-5 yang membentuk senyawa kompleks dengan logam Al atau adanya substituen orto dihidroksi cincin A dan cincin B sedangkan penambahan pereaksi geser $AlCl_3 + HCl$ tidak memberikan pergeseran panjang gelombang sama dengan pereaksi geser $AlCl_3$ hal ini menunjukkan tidak adanya orto dihidroksi pada senyawa hasil isolasi. Penambahan pereaksi natrium asetat $NaOAc$ tidak memberikan pertambahan panjang gelombang yang menunjukkan pada atom C-7 tidak mempunyai gugus hidroksi OH

(Harborne, 1982). Spektrum inframerah senyawa kuersetin 3,7-dimetileter dalam kalium bromida KBr menunjukkan adanya puncak pita serapan pada bilangan gelombang ν pada 3204 cm^{-1} (vibrasi ulur OH), 1663 cm^{-1} (vibrasi ulur C=O yang terkonyugasi dengan aromatik), $1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ (vibrasi ulur C=C aromatis), dan 1148 cm^{-1} (vibrasi ulur C-O-C eter). Spektrum proton resonansi magnetik inti ^1H -RMI senyawa kuersetin 3,7-dimetileter dalam DMSO- d_6 memberi informasi adanya 5 proton aromatis dan 2 sinyal proton metoksi OCH_3 . Sinyal proton dari pergeseran kimia δ_{H} senyawa kuersetin 3,7-dimetileter hasil isolasi adalah sebagai berikut, 7,58 (d, J 2,2 Hz); 7,47 (dd; J 2,2 dan 8,3 Hz); 6,91 (d, 8,3 Hz); 6,68 (d, J 2;2 Hz); dan 6,35 ppm (d, J 2;2 Hz). Sinyal proton pergeseran kimia δ_{H} senyawa kuersetin 3,7-dimetileter pada pergeseran kimia δ pada 6,68 (1H, d, J 2;2 Hz); dan 6,35 ppm (1H, d, J 2;2 Hz). yang merupakan interaksi proton aromatis yang masing-masingnya pada posisi meta, umumnya merupakan proton aromatik pada posisi H-8 dan H-6 yang lazim untuk golongan flavonoid di cincin A atau mempunyai dioksigenasi pada atom C-5 dan C-7. adanya hidroksi pada atom C-5 terlihat sinyal singlet pada δ_{H} 12, 67 ppm yang merupakan ciri khas adanya hidrogen dari hidroksi yang mempunyai ikatan hidrogen dengan gugus karbonil pada atom C-4. Sinyal proton pada 6,24 ppm lebih *shielding* daripada δ 6,68 ppm, hal ini menunjukkan δ 6,24 ppm merupakan proton H-6 dimana proton lebih banyak elektron karena diapit oleh dua gugus hidroksi. Pergeseran kimia δ_{H} senyawa kuersetin 3,7-dimetileter pada 7,58 (1H, d, J 2,2 Hz); 7,47 (1H, dd; J 2,2 dan 8,3 Hz); dan 6,91 (1H, d, 8,3 Hz) yang masing-masingnya mewakili satu sinyal proton merupakan sinyal proton aromatik sistem ABX. Sinyal doublet-doublet proton pada δ_{H} 7,47 ppm mempunyai interaksi dengan proton meta pada 7,58 ppm dan orto pada 6,91 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa cincin B senyawa kuersetin 3,7-dimetileter mempunyai substituen dioksigenasi pada atom C-3 dan C-4. Dua sinyal singlet pada δ_{H} 3,80 dan 3,86 ppm merupakan sinyal dari dua gugus metoksi. Spektrum ^{13}C -RMI senyawa kuersetin 3,7-dimetileter memperlihatkan adanya 17 atom karbon. Sinyal δ_{C} pada 177,7 dan 137,7 ppm merupakan ciri khas dari senyawa flavonoid turunan flavonol. Sinyal δ_{C} pada 145,0 dan 155,7 ppm merupakan ciri khas dari ortodihidroksi pada cincin B, dimana pada umumnya δ_{C} hidroksi sekitar 160an ppm.

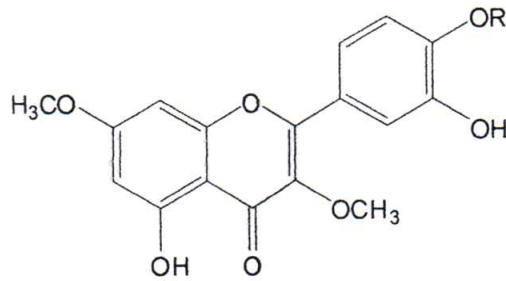
Sinyal proton δ_H senyawa kuersetin 3,7-dimetileter hasil isolasi dapat dilihat pada Tabel-2 sedangkan δ_C dapat dilihat pada Tabel-3.

5.3. Identifikasi Senyawa kuersetin 3,7,4-trimetileter

Penentuan struktur senyawa kuersetin 3,7,4-trimetileter hasil isolasi pada prinsipnya penentuan struktur molekul kimianya identik dengan kuersetin 3,7-dimetileter. Perbedaan pembahasan senyawa kuersetin 3,7,4-trimetileter dengan senyawa kuersetin 3,7-dimetileter hanya bisa terlihat pada spektrum resonansi magnet inti sedangkan spektrum ultraviolet dan inframerah tidak ada perbedaan.

Senyawa kuersetin 3,7,4-trimetileter berwujud kristal jarum kuning muda, t.l. 173-175°C (Wang, 1989 : 222-223°C). Spektrum ultraviolet senyawa kuersetin 3,7,4-trimetileter dalam metanol memberikan panjang gelombang λ_{maks} 255 dan 348 nm. Efek batokromik dengan penambahan pereaksi geser $AlCl_3$, $AlCl_3 + HCl$ dan $NaOAc$ memberi penambahan panjang gelombang yang sama dengan senyawa kuersetin 3,7-dimetileter. Spektrum inframerah senyawa kuersetin 3,7,4-trimetileter dalam kalium bromida KBr menunjukkan adanya puncak pita serapan pada bilangan gelombang ν pada 3443 cm^{-1} (vibrasi ulur OH), 1641 cm^{-1} (vibrasi ulur C=O yang terkonyugasi dengan inti aromatik), 1500-1600 cm^{-1} (vibrasi ulur C-C aromatis), dan 1148 cm^{-1} (vibrasi ulur C-O-C eter). Spektrum proton resonansi magnet inti 1H -RMI senyawa kuersetin 3,7,4-trimetileter dalam $DMSO-d_6$ memberi informasi adanya 5 proton aromatis dan 3 sinyal proton metoksi. Pada inti sinyal proton senyawa kuersetin 3,7,4-trimetileter sama dengan senyawa kuersetin 3,7-dimetileter hanya dibedakan dengan adanya penambahan satu gugus metoksi. Sinyal proton δ_H senyawa kuersetin 3,7,4-trimetileter adalah sebagai berikut, 12,61 (1H, s), 7,55 (d, J 1,5 Hz); 7,54 (dd; J 1,5 dan 7,3 Hz); 7,09 (d, 7,3 Hz); 6,67 (d, J 2;2 Hz); dan 6,33 ppm (d, J 2;2 Hz) untuk proton aromatik sedangkan tiga sinyal singlet pada δ_H 3,81; 3,86; dan 3,88 ppm yang masing-masingnya mewakili gugus metoksi. Sinyal karbon senyawa kuersetin 3,7,4-trimetileter memperlihatkan adanya 18 atom karbon.

Sinyal proton δ_H senyawa kuersetin 3,7,4-trimetileter hasil isolasi dapat dilihat pada Tabel-2 sedangkan δ_C dapat dilihat pada Tabel-3.



R=H : kuersetin-3,7,-dimetileter

R=CH₃ : kuersetin 3,7,4'-trimetileter

Tabel-2. δ_H senyawa kuersetin 3,7-dimetileter dan kuersetin 3,7,4 -trimetileter

Posisi H	Kuersetin 3,7-dimetileter isolasi	Kuersetin 3,7-dimetileter (Urbatsch, 1976)	Kuersetin 3,7,4-trimetileter isolasi	Kuersetin 3,7,4-trimetileter (Urbatsch, 1976)
H-6	6,35 (d, J 2,2 Hz)	6,17 (d, J 2,5 Hz)	6,33 (d, J 2,2 Hz)	6,11 (d, J 2,0 Hz)
H-8	6,68 (d, J 2,2 Hz)	6,45 (d, J 2,5 Hz)	6,67 (d, J 2,2 Hz)	6,41 (d, J 2,0 Hz)
H-2	7,58 (d, J 2,2 Hz)	7,66 (d, J 2,0 Hz)	7,55 (d, J 1,5 Hz)	7,55 (d, J 2,0 Hz)
H-5'	6,91 (d, 8,3 Hz)	6,85 (d, 8,5 Hz)	6,91 (d, 7,3 Hz)	6,79 (d, 5,5 Hz)
H-6'	7,47 (dd; J 2,2 dan 8,3 Hz)	7,43 (dd; J 2,0 dan 8,5 Hz)	7,54 (dd; J 1,5 dan 7,3 Hz)	7,47 (dd; J 2,0 dan 5,5 Hz)
3-OCH ₃	3,86; s	3,84; s	3,86; s	3,86; s
7-OCH ₃	3,80; s	3,78; s	3,81; s	3,80; s
4'-OCH ₃	-	-	3,88; s	-

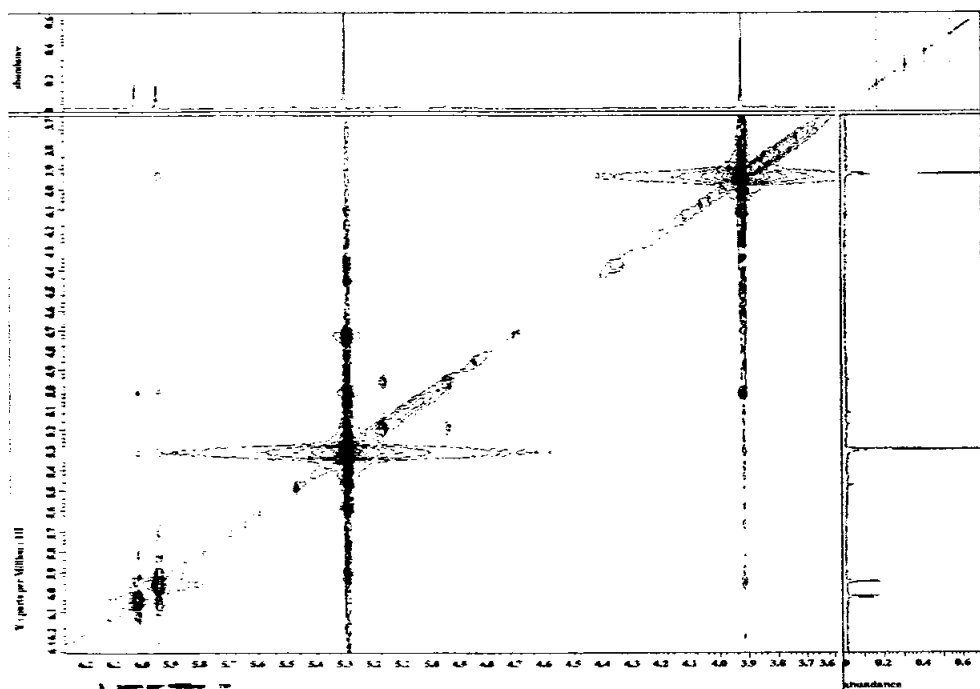
Tabel-2. δ_H senyawa kuersetin 3,7-dimetileter dan kuersetin 3,7,4 -trimetileter

Posisi C	Kuersetin 3,7-dimetileter isolasi	Kuersetin 3,7,4-trimetileter isolasi	Kuersetin 3,4-dimetileter (Harborne, 1982)	Kuersetin 7,4-dimetileter (Harborne, 1982)
C-1	-	-	-	-
C-2	145,0	146,1	146,2	146,2
C-3	137,7	137,7	138,2	136,4
C-4	177,7	177,8	178,1	176,0
C-5	160,1	160,7	161,6	160,4
C-6	97,5	97,5	98,8	97,4
C-7	164,8	164,8	164,4	164,9
C-8	92,0	92,0	93,8	91,8
C-9	156,0	156,0	156,6	156,0
C-10	105,0	105,0	104,5	104,0
C-1'	120,5	122,0	122,6	123,4
C-2'	115,5	114,9	115,2	114,8
C-3'	148,6	150,1	146,6	146,7
C-4'	155,7	155,3	150,3	149,4
C-5'	115,4	111,7	111,8	111,7
C-6'	120,4	120,2	120,5	119,8
3-OCH ₃	59,5	59,6	59,8	-
7-OCH ₃	55,9	55,9	-	55,9
4'-OCH ₃	-	55,6	55,7	55,5

5.4. Identifikasi Senyawa Rhamnositrin

Senyawa rhamnositrin atau kaempferol 7-metileter merupakan senyawa flavonoid turunan flavonol, berwujud padatan kuning muda. Spektrum ultraviolet senyawa rhamnositrin dalam metanol memberikan panjang gelombang λ_{maks} 258 dan 348 nm, yang merupakan puncak serapan dari sistem senyawa flavonoid jenis flavon atau flavonol (Andersen, 2006; Harborne, 1982). Efek batokromik senyawa rhamnositrin dengan penambahan AlCl_3 , dan $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ memberikan efek penambahan panjang gelombang sama dengan senyawa kuersetin 3,7-dimetileter dan kuersetin 3,7,4'-trimetileter sedangkan penambahan pereaksi NaOAc tidak mengalami penambahan panjang gelombang. Spektrum proton resonansi magnetik inti $^1\text{H-NMR}$ senyawa rhamnositrin dalam CDCl_3 memberi informasi adanya 6 proton aromatis dan satu gugus metoksi. Sinyal proton dari pergeseran kimia senyawa rhamnositrin hasil isolasi adalah sebagai berikut, 14,26; 7,77; 7,52; 6,87; 6,02, 5,95 dan 3,92 ppm. Sinyal proton aromatik cincin A senyawa rhamnositrin pada pergeseran kimia δ pada 6,02 ppm dengan sinyal doublet (1H, d, J 2,45 Hz), dan 5,95 ppm dengan sinyal doublet (1H, d, J 2,45 Hz) memberikan informasi bahwa interaksi proton aromatis yang masing-masingnya pada posisi meta yang umum di cincin A yakni adanya substituen pada atom C-5 dan C-7. Dengan demikian sinyal proton pada δ 6,02 dan 5,95 ppm memberikan informasi bahwa proton aromatik cincin A berada pada H-8 dan H-6. Sinyal proton doublet pada pergeseran kimia 7,52 dan 6,87 ppm memperlihatkan masing-masing sinyal tersebut mewakili dua proton dengan multiplisitas konstanta kopling yang masing-masingnya 8,6 Hz. Hal ini menunjukkan bahwa cincin B senyawa apigenin mempunyai monooksigenasi pada atom C-4. Dengan demikian pergeseran kimia 7,52 dan 6,87 ppm memperlihatkan adanya dua proton simetris yang masing-masing berada posisi orto dimana hal ini terlihat adanya multiplisitas dengan masing-masing J 8,6 Hz. Sinyal pergeseran kimia pada 7,52 ppm lebih *deshielding* daripada 6,87 ppm, hal ini memperlihatkan bahwa δ 7,52 ppm berada pada posisi H-2' / H-6'. Hal ini disebabkan posisi H-2' / H-6' berada pada posisi orto terhadap sistem sinamoi. Dengan demikian δ 7,01 ppm berada pada posisi H-3' / H-5'. Sinyal singlet pada pergeseran kimia δ 14,26 ppm merupakan proton hidroksi pada atom C-5 yang membentuk ikatan hidrogen dengan gugus karbonil $\text{C}=\text{O}$ pada atom C-4 selaras dengan spektrum ultraviolet pada penambahan pereaksi AlCl_3 . Penempatan posisi

metoksi pada atom C-7 dapat dibuktikan melalui percobaan 2D- RMI ROESY seperti terlihat pada Gambar-1. Percobaan ROESY memperlihatkan adanya interaksi antar bidang antara H-6 dengan proton metoksi pada atom C-7.



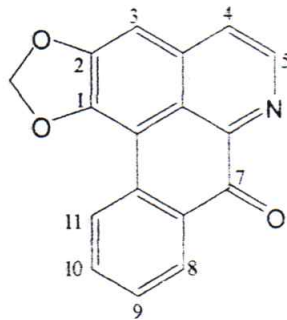
Gambar-1. Percobaan 2D- RMI ROESY senyawa rhamnositrin

5.5. Identifikasi Senyawa Liriodenin

Senyawa liriodenin merupakan alkaloid golongan benzilisokuinolin turunan oksoaporfirin, berwujud padatan kuning muda. Spektrum ultraviolet senyawa liriodenin hasil isolasi dalam metanol memberikan panjang gelombang λ_{maks} 272 dan 317 nm. Efek batokromik dengan penambahan basa NaOH memberikan λ_{maks} 270 dan 383 nm. Spektrum massa *low resolution* senyawa liriodenin dengan menggunakan metode FAB-MS memberikan puncak massa relatif molekul M_r pada m/e 276 ($M^+ + 1$) yang sesuai dengan massa senyawa liriodenin hasil isolasi. Spektrum proton resonansi magnetik inti 1H -RMI senyawa liriodenin dalam DMSO- d_6 memberi informasi adanya 7 proton aromatis dan dua proton metilendioksi. Sinyal proton δ_H senyawa liriodenin hasil isolasi adalah sebagai berikut, 8,83 (d, 5,13 Hz); 8,67 (d, 8,02 Hz); 8,38 (dd; 8,02 dan 1,47 Hz); 8,05 (d; 5,13 Hz); 7,90 (dt; 8,02 Hz); 7,66 (dt; 8,02 Hz); 7,58 (s) yang merupakan δ_H

proton aromatik; sedangkan proton metilendioksi terlihat pada δ_H 6,51 (s) mewakili dua proton. Sinyal singlet pada δ_H 7,58 ppm merupakan proton H-3. Sinyal doublet pada δ_H 8,83 (d, 5,13 Hz) dan 8,05 (d; 5,13 Hz) merupakan proton H-5 dan H-4 dari cincin isokuinolin. Sinyal proton δ_H : 8,67 (d, 8,02 Hz); 8,38 (dd; 8,02 dan 1,47 Hz); 7,90 (dt; 8,02 Hz); dan 7,66 (dt; 8,02 Hz) menunjukkan bahwa cincin benzil tidak mempunyai substituen. Posisi masing-masing proton senyawa lirioden hasil isolasi, diperkuat dengan spektrum 2D-RMI COSY H-H seperti terlihat pada Gambar-1. Sinyal singlet pada δ_H 6,51 ppm merupakan proton metilendioksi yang mewakili dua proton. Posisi masing-masing proton senyawa liriodenin hasil isolasi, diperkuat dengan spektrum 2D-RMI COSY H-H seperti terlihat pada Gambar-1. Spektrum ^{13}C -RMI senyawa liriodenin memperlihatkan adanya 17 sinyal atom karbon, yakni δ_C : 180,9; 151,5; 148,3; 144,3; 144,2; 135,2; 133,9; 132,3; 130,6; 128,3; 127,6; 126,8; 124,3; 122,4; 106,0; 103,2; dan 103,1 ppm. Sinyal karbon δ_C 180,9 ppm merupakan ciri khas atom karbonil C=O dari turunan oksoaporfin.

Sinyal proton δ_H 1H dan 2D-RMI senyawa liriodenin hasil isolasi dapat dilihat pada Tabel-4.

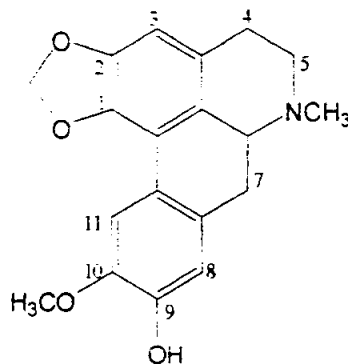


Tabel-4. 1D dan 2D-RMI senyawa liriodenin hasil isolasi

Posisi H	Liriodenin isolasi	COSY	Liriodenin (Guinaudeau, 1994)
H-1	-	-	-
H-2	-	-	-
H-3	7,58 (s)	-	7,22 (s)
H-4	8,05 (d, 5,13 Hz)	H-5	7,80 (d, 5,00 Hz)
H-5	8,83 (d, 5,13 Hz)	H-4	8,90 (d, 5,00 Hz)
H-6	-	-	-
H-7	-	-	-
H-8	8,38 (dd, 8,02 dan 1,47 Hz)	H-9, H-10	8,38 (dd, 8,00 dan 2,00 Hz)
H-9	7,66 (dt, 8,02 Hz)	H-8, H-10	7,66 (dt, 8,00 Hz)
H-10	7,90 (dt, 8,02 Hz)	H-9, H-11	7,78 (dt, 8,00 Hz)
H-11	8,67 (d, 8,02 Hz)	H-10	8,68 (d, 8,00 Hz)

5.6. Identifikasi Senyawa Aktinodapnin

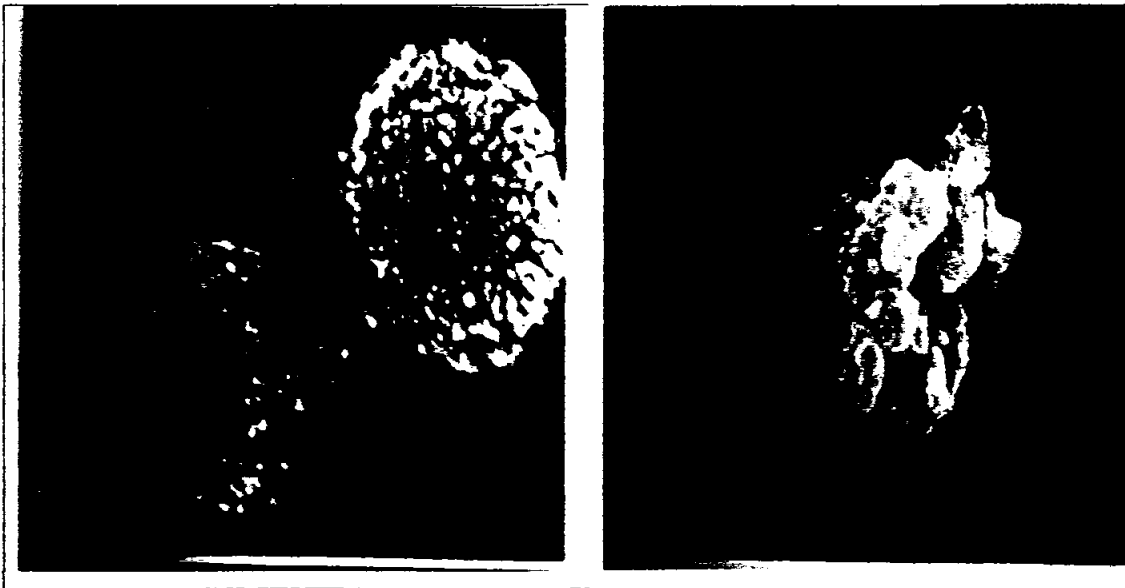
Senyawa aktinodapnin merupakan alkaloid golongan benzilisoquinolin turunan aporfin, berwujud padatan kuning muda. Spektrum ultraviolet senyawa hasil isolasi dalam metanol memberikan panjang gelombang λ_{maks} 269, 283 dan 313 nm yang merupakan ciri khas spektrum aporfin yang mempunyai substituen tetraoksigenasi pada posisi 1,2,9,10 (Sangster, 1965). Spektrum proton resonansi magnetik inti ^1H -RMI senyawa aktinodapnin dalam CDCl_3 memberi informasi adanya tiga proton singlet aromatis, dua proton metilendioksi, satu proton metoksi, dan satu proton N-metil. Sinyal proton δ_{H} senyawa hasil isolasi adalah sebagai berikut, 7,63 (1H, s); 6,80 (1H, s), 6,53 (1H, s), 6,10 (1H, d; 1,20 Hz); 5,95 (1H, d; 1,20 Hz); 3,93 (3H, s) dan 2,17 (3H, s). Sinyal proton δ_{H} pada 7,63 (1H, s); 6,80 (1H, s), dan 6,53 (1H, s) merupakan tiga buah proton aromatik yang sesuai dengan turunan aporfin dengan substituen tetraoksigenasi pada posisi 1,2,9,10. Sinyal pada 6,10 dan 5,95 ppm yang masing-masing multiplisitas 1,20 Hz merupakan sinyal dari metilendioksi $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$, sinyal singlet pada 3,93 ppm merupakan sinyal gugus metoksi dan sinyal singlet 2,17 ppm merupakan sinyal dari N-metil. Dengan demikian, substituen tetraoksigenasi adalah metilendioksi, hidroksi dan metoksi. Untuk membuktikan posisi substituen metilendioksi, hidroksi dan metoksi untuk posisi 1,2,9,10 dilakukan percobaan 2D-RMI ROESY yang memperlihatkan adanya interaksi antar bidang antara proton aromatik *deshielding* 7,63 (H-11) dengan gugus metoksi. Dengan demikian posisi gugus metoksi berada pada atom C-10. Oleh karena itu, hidroksi berada pada posisi C-9 dan metilendioksi berada pada posisi C-1 dan C-2.



5.7. Uji Sitotoksik Senyawa Flavonoid dan Alkaloid Terhadap Sel Murin Leukemia

Senyawa flavonoid dan alkaloid hasil isolasi diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel murin leukemia P-388 mengikuti standard NCI (National Cancer Institute) Amerika berdasarkan metode Alley (1988). Menurut Alley (1988) efek sitotoksik senyawa aktif terhadap sel kanker secara *in vitro*, senyawa uji dikategorikan sangat aktif jika nilai $IC_{50} < 2 \mu\text{g/ml}$, aktif jika nilai IC_{50} 2-4 $\mu\text{g/ml}$ dan tidak aktif jika nilai $IC_{50} > 4 \mu\text{g/ml}$. Konsentrasi senyawa aktif terhadap sel kanker secara *in vitro* dapat juga dinyatakan dalam bentuk mikromolar μM , dimana senyawa uji dikategorikan sangat aktif jika nilai $IC_{50} < 10 \mu\text{M}$, aktif jika nilai IC_{50} 10-20 μM dan tidak aktif jika nilai $IC_{50} > 20 \mu\text{M}$ (Ito, 2003).

Fraksi flavonoid dan alkaloid yang terlebih dahulu diuji efek sitotoksiknya terhadap sel murin leukemia P-388. Fraksi flavonoid dan alkaloid yang memperlihatkan efek sitotoksik selanjutnya dilakukan pemurnian untuk memperoleh senyawa murni flavonoid dan alkaloid. Senyawa flavonoid dan alkaloid hasil isolasi terlebih dahulu ditentukan struktur molekulnya menggunakan data spektroskopi UV, FTIR, MS, 1D dan 2D-RMI. Senyawa flavonoid aktif hasil isolasi antara lain kuersetin 3,7-dimetileter, kuersetin 3,7,4-trimetileter, dan rhamnositrin. Senyawa alkaloid hasil isolasi antara lain liriodenin dan aktinodapnin. Berdasarkan hasil uji sitotoksik senyawa flavonoid dan alkaloid hasil isolasi terhadap sel murin leukemia P-388 dengan menggunakan pereaksi MTT yang selanjutnya observasi morfologi untuk menghitung jumlah sel yang mati (apoptosis) dilakukan pengukuran SEM (scanning elektron mikroskop) seperti terlihat pada Gambar-2.



Gambar-2. Observasi morfologi SEM a. Kontrol positif b. liriodenin

Berdasarkan uji sifat sitotoksik senyawa flavonoid dan alkaloid hasil terhadap sel murin leukemia P-388 dengan menggunakan pereaksi MTT diperoleh nilai IC_{50} seperti terlihat pada Tabel-5.

Tabel-5. Nilai IC_{50} senyawa flavonoid dan alkaloid hasil isolasi

No	Senyawa	Golongan	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) \pm SD
1	Kuersetin 3,7-dimetileter	Flavonol	$2,05 \pm 0,32$
2	Kuersetin 3,7,4 -trimetileter	Flavonol	$2,87 \pm 0,69$
3	Rhamnositrin	Flavonol	$1,88 \pm 0,42$
4	Liriodenin	Oksoaporfin	$1,97 \pm 0,37$
5	Aktinodapnin	Aporfin	$3,97 \pm 0,76$

Berdasarkan hasil uji sitotoksik senyawa flavonoid hasil isolasi terhadap sel murin leukemia P-388 senyawa rhamnositrin (kaempferol 7-metil eter) lebih aktif dibandingkan daripada kuersetin 3,7-dimetileter dan kuersetin 3,7,4-trimetileter. Senyawa kuersetin 3,7-dimetileter lebih aktif daripada kuersetin 3,7,4-trimetileter, hal ini menunjukkan semakin banyak gugus metoksi menurunkan sifat sitotoksik. Senyawa alkaloid liriodenin lebih aktif aktinodapnin menunjukkan bahwa adanya gugus karbonil $C=O$ pada senyawa liriodenin meningkatkan sifat sitotoksik. Sifat sitotoksik kedua senyawa alkaloid tersebut belum dapat dipastikan mengingat data-data masih relatif sedikit. Hal ini perlu dilakukan uji sitotoksik untuk beberapa senyawa alkaloid jenis aporfin dan oksoaporfin.

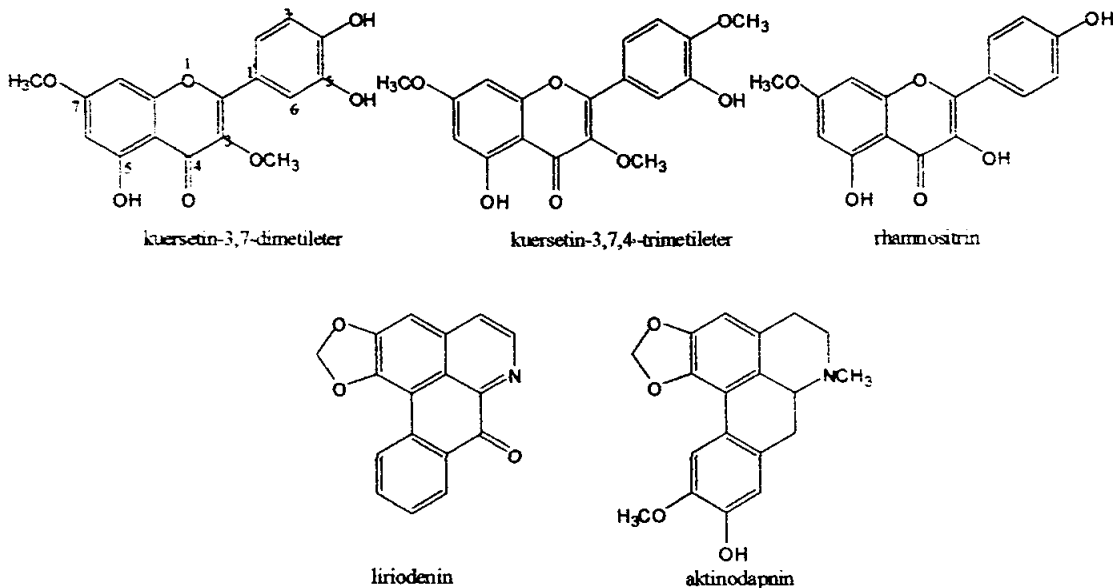
BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan terhadap senyawa flavonoid dan alkaloid dari ekstrak etilasetat *Saccopetalum horsfieldii* Benn dapat disimpulkan,

1. Tiga senyawa flavonoid jenis flavonol yakni kuersetin 3,7-dimetileter, kuersetin 3,7,4'-trimetileter dan rhamnositrin (kaempferol 7-metileter) serta dua senyawa alkaloid yakni liriodenin dan aktinodapnin telah dipisahkan kulit batang *Saccopetalum horsfieldii* Benn,



2. Uji sifat sitotoksik senyawa kuersetin 3,7-dimetileter, kuersetin 3,7,4'-trimetileter, kaempferol 7-metileter, liriodenin dan aktinodapnin terhadap sel murin leukemia P-388 memperlihatkan daya hambat IC_{50} masing-masing 2,05; 2,87; 1,88; 1,97 dan 3,97 $\mu\text{g/ml}$.
3. Hubungan struktur-aktivitas senyawa rhamnositrin (kaempferol 7-metil eter), kuersetin 3,7-dimetileter dan kuersetin 3,7,4'-trimetileter terhadap sel murin leukemia P-388 disebabkan adanya penambahan gugus hidroksi pada C-3' akan menurunkan sifat sitotoksik pada senyawa turunan kuersetin. Adanya penambahan gugus metoksi pada senyawa kuersetin 3,7,4'-trimetileter menurunkan sifat sitotoksik dibandingkan senyawa kuersetin 3,7-dimetileter.

Senyawa alkaloid liriidenin lebih aktif terhadap aktinodapnin dipengaruhi dengan adanya gugus karbonil pada senyawa liriidenin.

6.2. Saran

Melanjutkan uji aktivitas terhadap sel kanker yang lain pada tingkat molekuler atau seluler sehingga memberikan informasi yang lebih luas hubungan antara struktur senyawa flavonoid dengan aktivitas antikanker yang terdapat pada *Saccopetalum horsfieldii* Benn.

DAFTAR PUSTAKA

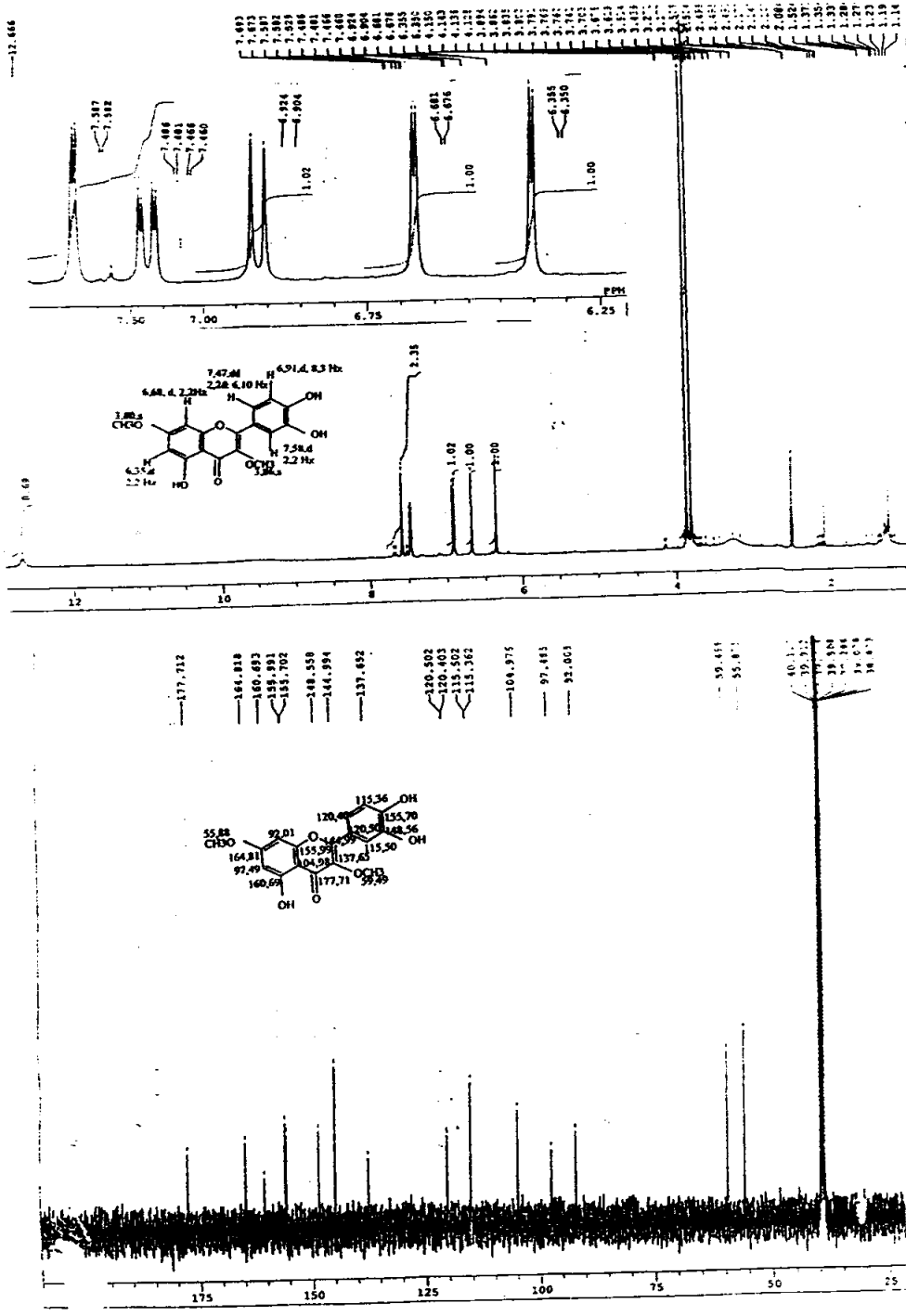
- Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, Abbot, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H., and Boyd, M.R., 1988, Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cells Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay. *Cancer Research*, 48, 589-601
- Ancuceanu, R.V. and Istudor, V., 2004, Pharmacologically Active Natural Product for Lung Cancer, *Alternative Medicine Review*, 9 (4), 402-419
- Andersen, O.M., and Markham, K.R., 2006, Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications, CRC Press, New York
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Poel, B.V., Pieters, L., Vlietinck, A.J., and Berghe, D.V., 1998, Structure –Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of *Xanthine Oxidase* and Superoxidase Scavengers, *J. Nat. Pro.*, 61, 71-76.
- Cuendet, M., Hostetmann, K., and Potteral, O., 1997, Flavonoids with Free Radical Scavenging From *Fagrae blumei*. *Helvetica Chimica Acta*, 80, 1144-52.
- Guinaudeau, H., Leboeuf, M., and Cave, A., 1994, Aporphine Alkaloids IV, *J. Nat. Pro.*, 57, 1043.
- Harborne, J.B. and Mabry, T.J., 1982, *The Flavonoids: Advances in Research*, Chapman and Hall Ltd., London-New York, 75-76
- Ito, T., Akao, Y., Yi, H., Ohguchi, K., Matsumoto, K., Tanaka, T., Iinuma, M., and Nozawa, Y., 2003, Antitumor Effect of Resveratrol Oligomers Againsts Human Cancae Cell Lines and The Molecular Mechanism of Apoptosis Induced by Vaticanol C, *Carcinogenesis*, 24 (9), 1489-1497
- Kristanti., A.N., Tanjung, M., Aminah, S.A., Mahmiah, Fatimah, N. dan Hayashi H., 2004, Senyawa Flavonoid dari *Saccopetalum horsfieldii* Benn, *Symposium Nasional Natural Product of Chemistry XV, ITB, Bandung*
- Lin, M.L., Chen, C.T., Lee, H.H., and Lin, J.K., 2002, Prevention of Cellular ROS Damage by Isoviteixin and Related Flavonoids, *Planta Medica*, 68, 365-7.

- Jagetia, G.C. and Rao S.K., 2006, Evaluation of The Antineoplastic Activity of *Tinopora cordifolia* in Ehrlich Ascites Carcinoma Bearing Mice, *Biol. Pharm. Bull.*, 29(3), 460-466
- Jhons, S.R., Lamberton, J.A., and Sioumis, A.A., 1968, Alkaloids of *Xylopia papuana*, *Australian J. Chem.*, 21, 1383-1386
- Hakim, E.H., Achmad, S.A., Makmur, L. dan Syah, Y.M., 2001, Profil Kimia Annonaceae, *Bull. Indonesian Soc. Of Nat. Pro. Chem.*, 1(1), 1-11.
- Nayak, B.K., 1999, Mutation and Methylation Status of p53 Gene Promoter in Human Breast Tumours, *Tumor Biology*, 20, 341-346.
- Perruchon, S., 2004, Synthese und Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von Flavonoiden, *Dissertation*. Universität Dramstadt, Germany
- Plochmann, K., Korte, G., Koutsilieri, E., Richling, E., Riederer, P., Rethwilm, A., Schreier, P., and Scheller, C., 2007, Structure-Activity Relationships of Flavonoid-Induced Cytotoxicity on Human Leukemia Cells, *Archives of Biochem. And biophysics*, 1-9
- Rahman, A., 2001. *Bioassay Techniques for Drug Development*, Harwood Academic Publishers. Amsterdam. 65-72.
- Sangster, A.W., and Stuart, K.L., 1965, Ultraviolet of Alkaloids, *Chem. Res.*, 65, 81-89
- Santos, A., and Santana, A.E., 2001, Free Radical Scavenging Properties of Some Species of *Annona*. *Phytomedicine*, 8(2), 115-120
- Suryohudoyo, P., 2004, *Dasar Molekul Karsinogenesis*, Infomedika, Jakarta.
- Tabata, K., Motani, K., Takayanagi, N., Nishimura, R., Asami, S., Kimura, Y., Ukiya, M., Hasegawa, D., Akihisa, T. and Suzuki, T., 2005, Xanthoangelol, a Major Chalcone Constituent of *Angelica keiskei*, Induces Apoptosis in Neuroblastoma and Leukemia Cells, *Biol. Pharm. Bull.*, 28(8), 1404-1407
- Tanjung, M., Kristanti., A.N., dan Aminah, S.A., 2008, Senyawa Antikanker dari *Saccopetalum heterophylla* Hubungan Struktur Kimia dengan Aktivitas Antikanker, *Laporan Penelitian Unair*. Surabaya
- Tanjung, M., Kristanti., A.N., Suwito, H., Aminah, S.A., Mahmiah, Fauziah, N. dan Hayashi H., 2005, Senyawa Flavonoid dari *Saccopetalum horsfieldii* Benn., *Seminar Regional Natural Product of Chemistry ITB-UKM Malaysia*, Bali

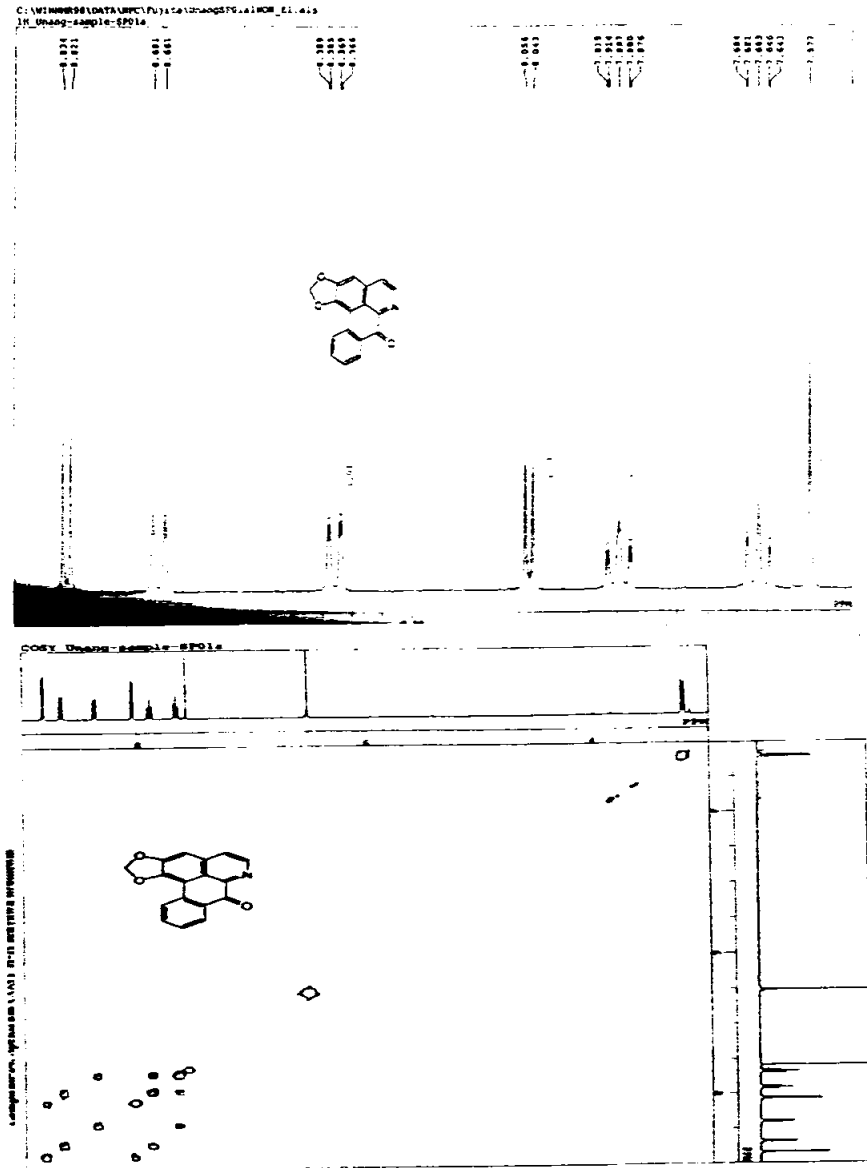
- Tanjung, M., Kristanti., A.N., Aminah, S.A., Ismaryono, D. Suwito,H dan Hayashi H., 2004, Senyawa Alkaloid dari *Saccopetalum horsfieldii* Benn, *Symposium Nasional Natural Product of Chemistry XV, ITB, Bandung*
- Tanjung, M., Kristanti., A.N., Suwito,H dan Hayashi H., 2003, Senyawa Fenolik dari *Saccopetalum horsfieldii* Benn, *Symposium Nasional Natural Product of Chemistry XIV, UNPAD, Bandung*
- Urbatsch, L.E., Mabry, T.J., Miyakado, M., Ohno, N., and Yoshioka,H., 1976, Flavonol Methyl Ethers from *Ericameria diffusa*, *Phytochem.*, 15, 440-1
- Wang, M.L., Du, J., Zhang, P.C., Chen, R.Y., Xie, F.Z., Zhao, B. and Yu, D.Q., 2002, Saccopetrine A and B, Two Novel Gamma-Lactones from *Saccopetalum prolicum*, *Planta Medica*, 68(8), 719-22.
- Wang, S., Zhang, Y.J., Chen, R.Y., and Yu, D.Q., 2002, Goniolactone A-F, Six New Styrylpyrone from The Roots of *Goniothlamus cheliensis*, *J.Nat.Pro.*, 65, 835-841.
- Wu., Y. and Chang, C., 1989, Flavonoid and Alkaloids from *Annona* spp., *Heterocycles*. 29(3), 463-475
- Zhang, H.J., Ma, C., Nguyen, V.H., Nguyen, M.C., Tan, G.T., Santarsiero. B.D., Mesecar, A.D., Soejarto, D.D., Pezzuto, J.M. and Fong, H.H., 2006, Miliusanones, a Class of Cytotoxic Agent from *Miliusasinensis* (Annonaceae), *J. Med. Chem.*, 49(2), 693-708

DAFTAR LAMPIRAN

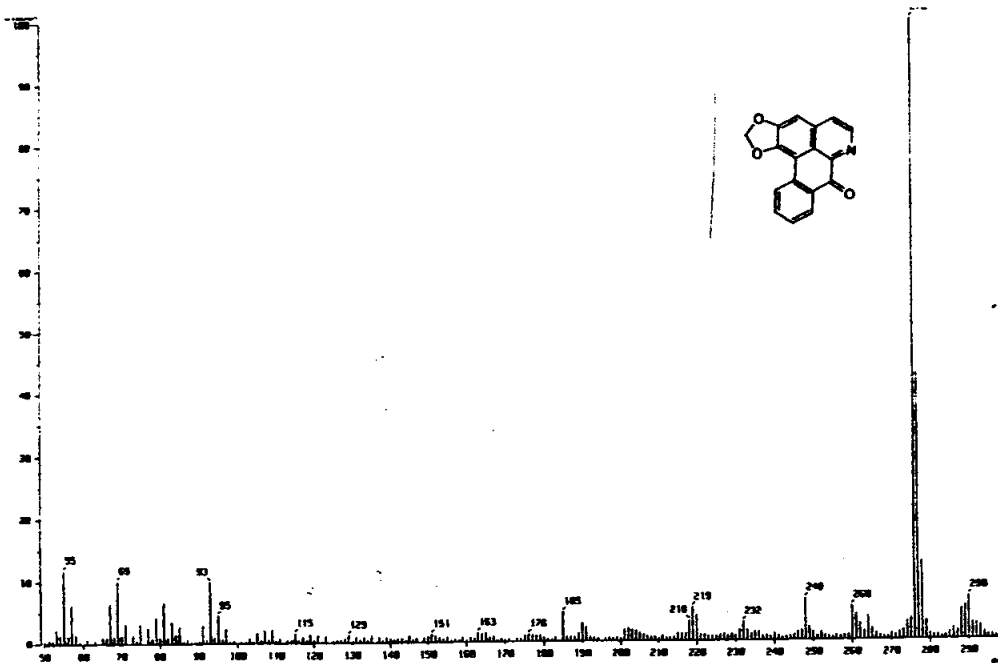
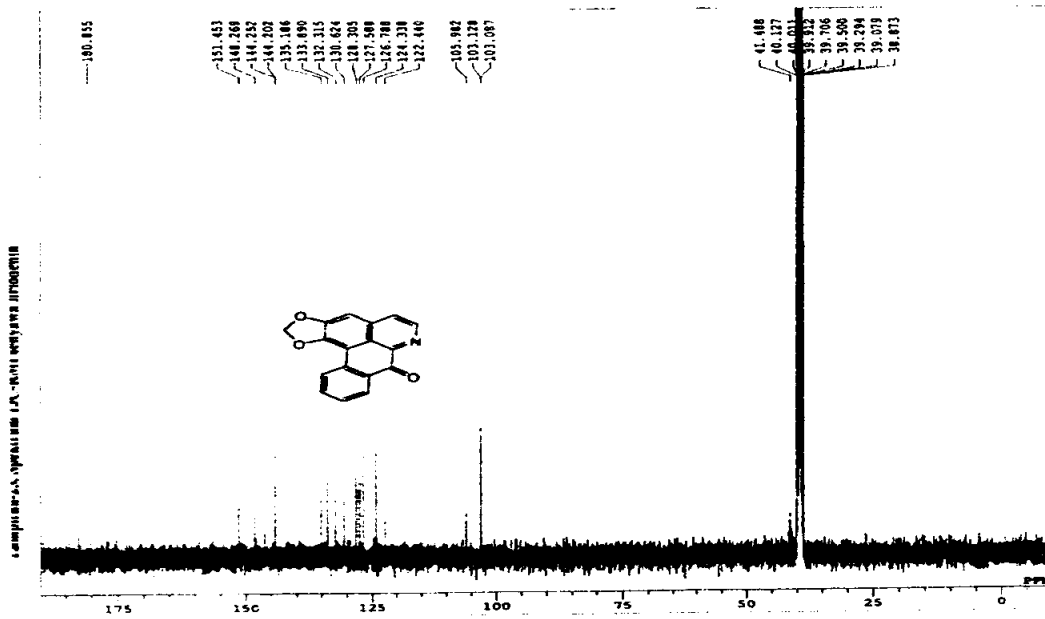
Lampiran-1. Spektrum 1H dan 13C-RMI kuersetin 3,7-dimeteiler



Lampiran-4. Spektrum 1H- RMI dan COSY liriodenin



Lampiran-4. Spektrum ¹³C-RMI dan spectrum massa liriodenin



Lampiran-5. Spektrum 1H-RMI aktinodapnin

