

**PENELUSURAN SENYAWA METABOLIT SEKUNDER DARI FRAKSI
ETIL ASETAT KAYU AKAR *Kleinhovia hospita* Linn. (PALIASA) DAN
UJI BIOAKTIVITASNYA**

*EXPLORATION OF SECONDARY METABOLITES FROM ETHYL
ACETATE EXTRACT OF THE ROOT WOOD OF *Kleinhovia hospita*
Linn.(PALIASA) PLANT AND THEIR BIOACTIVITIES*

YENNI PINTAULI PASARIBU



**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2011**

**PENELUSURAN SENYAWA METABOLIT SEKUNDER DARI FRAKSI
ETIL ASETAT KAYU AKAR *Kleinhovia hospita* Linn. (PALIASA) DAN
UJI BIOAKTIVITASNYA**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi

Kimia

Disusun dan diajukan oleh

YENNI PINTAULI PASARIBU

kepada

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2011

TESIS

PENELUSURAN SENYAWA METABOLIT SEKUNDER DARI FRAKSI
ETIL ASETAT KAYU AKAR *Kleinhovia hospita* Linn. (PALIASA)
DAN UJI BIOAKTIVITASNYA

Disusun dan diajukan oleh

YENNI PINTAULI PASARIBU
Nomor Pokok P1100209010

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis

pada tanggal

dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui

Komisi Penasihat,

Prof. Dr. Nunuk Hariani S., MS

Ketua

Ketua Program Studi Kimia

Dr. Paulina Taba, M.Phill

Dr. Firdaus Zenta, MS

Anggota

Direktur Program Pascasarjana
Universitas Hasanuddin

Prof. Dr. Ir. Mursalim, M.Sc

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Yenni Pintauli Pasaribu

Nomor Mahasiswa : P1100209010

Program Studi : Kimia

menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, November 2011

Yang menyatakan

Yenni Pintauli Pasaribu

PRAKATA

Segala puji, hormat, dan kemuliaan penulis haturkan kepada Tuhan Yang Maha Kasih atas anugerah dan pertolongan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis ini.

Penelitian dan penulisan tesis ini dapat selesai berkat keterlibatan berbagai pihak, oleh sebab itu dengan penuh rasa hormat penulis menyampaikan terima kasih yang tulus kepada :

1. Prof. Dr. Nunuk Hariani Soekamto, MS sebagai pembimbing utama atas segala bimbingan, didikan, masukan, perhatian, dorongan, dan kesediaan meluangkan waktu setiap minggu secara rutin selama penulis melaksanakan penelitian dan penulisan tesis.
2. Bapak Dr. Firdaus Zenta, MS sebagai pembimbing pertama atas segala bimbingan dan masukan selama pelaksanaan penelitian dan penulisan tesis.
3. Bapak Prof. Dr. Alfian Noor, M.Sc, Prof. Dr. Abd. Rauf Patong, dan Dr. Nursiah La Nafie, M.Sc atas kesediaannya sebagai tim penguji dan memberikan saran untuk penyempurnaan tesis ini.
4. Bapak Rektor, Direktur Pascasarjana, Dekan FMIPA, Ketua Program Studi S2 Universitas Hasanuddin beserta seluruh staf atas dukungan yang diberikan selama mengikuti pendidikan.

5. Bapak Rektor Universitas Musamus dan Pemerintah Kabupaten Merauke atas izin dan tugas belajar yang diberikan untuk melanjutkan studi S2 di PPs UNHAS.
6. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional RI atas bantuan finansial berupa beasiswa BPPS dan biaya penelitian.
7. Dr. Paulina Taba, M.Phill atas dorongan semangat, nasehat dan perhatian serta para dosen Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin atas segala motivasi dan bekal ilmu pengetahuan yang telah diberikan selama penulis menjalani pendidikan.
8. Kepala Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin beserta analis Bapak M. Iqbal dan Ibu Suhartini atas bantuan yang diberikan selama melakukan penelitian.
9. Orangtua terkasih: ayahanda Domarsan Pasaribu, M.Si dan ibunda Lince C. Sinaga atas segala kasih sayang, kepercayaan, kesabaran, jerih payah dalam membesarkan dan mendidik serta dorongan untuk menuntut ilmu ke jenjang yang lebih tinggi.
10. Suami tercinta Johannes Frinando Sidabutar atas segala cinta kasih, kesabaran, doa dan kesetiaan; juga ananda tercinta Windi Anggi Abigail Sidabutar yang selalu menemani melewati hari-hari dengan tawa dan canda yang menyejukkan hati.
11. Saudara-saudara terkasih: Chintia Imelda Pasaribu, SP, Korchnoi Pasaribu, ST, Margareth Piesesha Pasaribu, Cyndi Y.P. Pasaribu,

Jogi Nabasa Pasaribu, dan Helda Anova Sidabutar atas segala dukungan dan doa selama ini.

12. Rekan peneliti Abdillah Thamrin atas kerjasama, dorongan semangat dan motivasi dalam melalui suka duka masa perkuliahan dan penelitian serta rekan-rekan tim KOBA: Ahmad Ridhay, Usman, Nurmalasari, dan Jamius atas kerjasama dan bantuannya selama melaksanakan penelitian.
13. Rekan-rekan sepejuangan program Pascasarjana Kimia UNHAS 2009: Yorinda Buyang, Anita Purnamasari, Akhiri Saleh, Asni, Marlina, Makmun, Sri Hidayat, Nov Irmawati, dan Ika Septiani serta rekan-rekan Pascasarjana Kimia UNHAS lainnya yang tidak dapat dituliskan satu persatu atas dorongan dan motivasi dalam melalui suka dan duka masa perkuliahan dan penelitian.
14. Kepada seluruh keluarga, rekan dan semua pihak yang telah memberikan bantuannya dalam bentuk apapun namun tidak dapat dituliskan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih banyak kekurangan, namun diharapkan dapat bermanfaat bagi kita semua untuk menambah ilmu pengetahuan terutama dalam bidang Kimia Organik Bahan Alam.

Makassar, Oktober 2011

Yenni Pintauli Pasaribu

ABSTRAK

YENNI PINTAULI PASARIBU. *Penelusuran Senyawa Metabolit Sekunder dari Fraksi Etil Asetat Kayu Akar *Kleinhovia hospita* Linn. (Paliasa) dan Uji Bioaktivitasnya* (dibimbing oleh Nunuk Hariani Soekamto dan Firdaus Zenta).

Kebutuhan akan obat yang aman semakin meningkat dewasa ini. Tumbuhan obat telah banyak digunakan untuk mengobati berbagai penyakit termasuk kanker karena relatif jarang menimbulkan efek samping. Tumbuhan *Kleinhovia hospita* Linn. (paliasa) telah banyak digunakan sebagai obat tradisional dan potensial dikembangkan sebagai sediaan fitofarmaka. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan menentukan struktur molekul metabolit sekunder pada ekstrak etil asetat kayu akar *K. hospita* serta menentukan bioaktivitas senyawa yang diperoleh terhadap sel kanker rahim.

Teknik pemisahan yang digunakan terdiri atas ekstraksi, fraksinasi, dan pemurnian. Sampel kayu akar dimaserasi dengan metanol dan dievaporasi pada tekanan rendah hingga diperoleh maserat pekat. Selanjutnya maserat dipartisi dengan *n*-heksan, kloroform, dan etil asetat. Ekstrak etil asetat difraksinasi dengan kromatografi kolom vakum (KKV) dan kromatografi kolom tekan (KKT) serta direkristalisasi untuk memperoleh senyawa murni. Struktur senyawa ditentukan berdasarkan analisis data IR, ¹H NMR, ¹³C NMR, DEPT, HMQC, COSY, dan HMBC. Uji bioaktivitas primer dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) sedangkan bioaktivitas sekunder dilakukan terhadap sel kanker serviks manusia (HeLa).

Metabolit sekunder yang ditemukan adalah senyawa alkaloid quinolin **[I]** dan senyawa steroid **[II]**. Kedua senyawa tersebut bersifat non toksik terhadap *A. salina* dengan LC₅₀ 1511,77 dan 547,45 µg/ml serta memiliki bioaktivitas rendah terhadap sel kanker rahim HeLa dengan IC₅₀ 429,54 dan 626,61 µg/ml.

ABSTRACT

YENNI PINTAULI PASARIBU. *Exploration of Secondary Metabolites from Ethyl Acetate Extract of the Root Wood of *Kleinhovia hospita* Linn. (Paliasa) Plant and Their Bioactivities.* (supervised by Nunuk Hariani Soekamto dan Firdaus Zenta).

The need for safe drugs has been increasing nowadays. Medicinal plants has been widely used to treat various disease including cancer because it is relatively rare side effects. *Kleinhovia hospita* Linn. (paliasa) plant has been used as a traditional medicine and potential to be developed as phytopharmaca material. The purpose of this research is to determine the structure of secondary metabolites in the ethyl acetate extract of the root wood and their bioactivities against HeLa cell line.

Separation techniques used consisted of extraction, fractionation, and purification. The dried powder root wood was macerated with methanol and evaporated under reduced pressure to yield crude extract. The methanol extract was successively partitioned with n-hexane, chloroform and ethyl acetate. Ethyl acetate extract was fractionated by Vaccum Liquid Chromatography (VLC) and Flash Chromatography (FC) and recrystalized to yield pure compound. The structure of compounds were determined on the basis of spectroscopic evidence including IR, ¹H NMR, ¹³C NMR, DEPT, HMQC, COSY, dan HMBC. Primary bioactivity was tested using Brine Shrimp Lethality Test (BST) method and the secondary bioactivity was determined against HeLa cell line.

Isolated compounds were alkaloid quinoline compound [I] and steroid [II] compound. The two compounds were non toxic against *A. salina* with LC₅₀ 1511,77 dan 547,45 µg/ml respectively and showed low activity against HeLa cell line with IC₅₀ 429,54 and 626,61 µg/ml respectively.

DAFTAR ISI

	halaman
PRAKATA	v
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN	xvii
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	8
C. Tujuan Penelitian	8
D. Manfaat Penelitian	8
II. TINJAUAN PUSTAKA	10
A. Uraian Tentang Sterculiaceae	11
B. Uraian Tentang <i>Kleinhovia hospita</i> Linn.	13
1. Taksonomi Tumbuhan	13

2. Morfologi Tumbuhan	14
3. Khasiat	15
C. Fitokimia Tumbuhan Sterculiaceae	17
1. Alkaloid	17
2. Fenilpropanoid	19
3. Fenol dan Asam Fenolat	21
4. Flavonoid	22
5. Steroid	24
6. Terpenoid	26
D. Bioaktivitas	28
1. Uji Bioaktivitas	28
2. Bioaktivitas Antikanker Tumbuhan Sterculiaceae	29
E. Kerangka Pikir Penelitian	31
III. METODE PENELITIAN	33
A. Alat dan Bahan	33
1. Alat	33
2. Bahan	33
B. Objek Penelitian	34
C. Waktu dan Tempat Penelitian	34
D. Prosedur Penelitian	35
1. Pengumpulan Sampel	35
2. Ekstraksi	35
3. Isolasi	35

4. Identifikasi	36
5. Uji Bioaktivitas	36
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	37
A. Hasil	37
1. Ekstraksi	37
2. Isolasi	37
3. Identifikasi	43
4. Bioaktivitas	44
B. Pembahasan	44
1. Senyawa [I]	44
2. Senyawa [II]	52
3. Bioaktivitas	54
V. KESIMPULAN DAN SARAN	57
A. Kesimpulan	57
B. Saran	57

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

DAFTAR TABEL

nomor		halaman
1.	Spesies-spesies dari Sterculiaceae dan aktivitas biologisnya	12
2.	Bioaktivitas antikanker tumbuhan Sterculiaceae	30
3.	Data spektrum IR senyawa [I]	45
4.	Data spektroskopi $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa [I]	48
5.	Data spektrum IR senyawa [II]	52
6.	Hasil uji bioaktivitas terhadap <i>A. salina</i> dan sel kanker rahim (<i>HeLa cell line</i>)	55

DAFTAR GAMBAR

nomor	halaman
1. Senyawa alkaloid dari tumbuhan Sterculiaceae	18
2. Senyawa alkaloid dari tumbuhan Sterculiaceae	19
3. Senyawa fenilpropanoid dari tumbuhan Sterculiaceae	20
4. Senyawa fenol dan asam fenolat	21
5. Senyawa flavonoid dari tumbuhan Sterculiaceae	23
6. Senyawa steroid dari tumbuhan Sterculiaceae	25
7. Senyawa terpenoid dari tumbuhan Sterculiaceae	27
8. Skema kerangka pikir	32
9. Kromatogram hasil analisis KLT fraksi utama A-I	38
10. Kromatogram hasil analisis KLT fraksi utama D ₁ - D ₉	39
11. Kromatogram hasil analisis KLT isolat [I]	40
12. Kromatogram hasil analisis KLT fraksi utama I ₁ – I ₁₅	41
13. Kromatogram hasil analisis KLT endapan I ₁₃ , I ₁₄ , I ₁₅	41
14. Kromatogram hasil analisis KLT isolat [II]	42
15. Spektrum IR senyawa [I]	45
16. Spektrum ¹³ C-NMR senyawa [I]	46
17. Spektrum DEPT 135 senyawa [I]	47
18. Spektrum ¹ H-NMR senyawa [I]	49
19. Usulan Struktur Senyawa [I]	51

20. Korelasi HMBC dan COSY usulan struktur senyawa [I]	51
21. Spektrum IR senyawa [II]	53
22. Kerangka struktur senyawa steroid	53

DAFTAR LAMPIRAN

nomor		halaman
1.	Hasil identifikasi sampel penelitian	65
2.	Bagan ekstraksi dan isolasi kayu akar <i>K. hospita</i> Linn.	66
3.	Kromatogram hasil fraksinasi ekstrak EtOAc	67
4.	Kromatogram hasil fraksinasi fraksi D + E	68
5.	Bagan isolasi fraksi D + E	69
6.	Kromatogram hasil fraksinasi fraksi I	70
7.	Bagan isolasi fraksi I	71
8.	Prosedur uji bioaktivitas <i>Brine Shrimp Lethality Test</i>	72
9.	Bagan kerja uji bioaktivitas terhadap <i>A. salina</i>	74
10.	Spektrum HMQC senyawa [I]	75
11.	Spektrum COSY senyawa [I]	76
12.	Spektrum HMBC senyawa [I]	77
13.	Prosedur uji bioaktivitas terhadap sel HeLa	78
14.	Hasil uji sitotoksisitas senyawa [I] terhadap sel HeLa	80
15.	Hasil uji sitotoksisitas senyawa [II] terhadap sel HeLa	84

DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

Lambang/singkatan	Arti dan keterangan
μl	mikroliter
$\mu\text{g/ml}$	mikrogram per milliliter
μM	mikromolar
EtOAc	etil asetat
CHCl_3	kloroform
MeOH	metanol
DMSO	dimetil sulfooksida
p.a	pure analyse
KLT	kromatografi lapis tipis
KKV	kromatografi kolom vakum
KKT	kromatografi kolom tekan
R _f	ratio of force
LC ₅₀	lethality concentration 50
IC ₅₀	inhibition concentration 50
UV	ultra violet

(ν_{maks})	bilangan gelombang
IR	Infrared
NMR	nuclear magnetic resonance
ppm	part per million
J	konstanta kopling
Hz	Hertz
s	singlet
d	doublet
dd	doublet-doublet
δ	geseran kimia
DEPT	distortionless enchancement due to polarization transfer
HMQC	heteronuclear magnetic quantum coherence
NOESY	nuclear overhauser effect spectroscopy
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
<i>et al.</i>	et all (dan kawan-kawan)

ABSTRAK

YENNI PINTAULI PASARIBU. *Penelusuran Senyawa Metabolit Sekunder dari Fraksi Etil Asetat Kayu Akar *Kleinhovia hospita* Linn. (Paliasa) dan Uji Bioaktivitasnya* (dibimbing oleh Nunuk Hariani Soekamto dan Firdaus Zenta).

Kebutuhan akan obat yang aman semakin meningkat dewasa ini. Tumbuhan obat telah banyak digunakan untuk mengobati berbagai penyakit termasuk kanker karena relatif jarang menimbulkan efek samping. Tumbuhan *Kleinhovia hospita* Linn. (paliasa) telah banyak digunakan sebagai obat tradisional dan potensial dikembangkan sebagai sediaan fitofarmaka. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan menentukan struktur molekul metabolit sekunder pada ekstrak etil asetat kayu akar *K. hospita* serta menentukan bioaktivitas senyawa yang diperoleh terhadap sel kanker rahim.

Teknik pemisahan yang digunakan terdiri atas ekstraksi, fraksinasi, dan pemurnian. Sampel kayu akar dimaserasi dengan metanol dan dievaporasi pada tekanan rendah hingga diperoleh maserat pekat. Selanjutnya maserat dipartisi dengan *n*-heksan, kloroform, dan etil asetat. Ekstrak etil asetat difraksinasi dengan kromatografi kolom vakum (KKV) dan kromatografi kolom tekan (KKT) serta direkristalisasi untuk memperoleh senyawa murni. Struktur senyawa ditentukan berdasarkan analisis data IR, ¹H NMR, ¹³C NMR, DEPT, HMQC, COSY, dan HMBC. Uji bioaktivitas primer dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) sedangkan bioaktivitas sekunder dilakukan terhadap sel kanker serviks manusia (HeLa).

Metabolit sekunder yang ditemukan adalah senyawa alkaloid quinolin **[I]** dan senyawa steroid **[II]**. Kedua senyawa tersebut bersifat non toksik terhadap *A. salina* dengan LC₅₀ 1511,77 dan 547,45 µg/ml serta memiliki bioaktivitas rendah terhadap sel kanker rahim HeLa dengan IC₅₀ 429,54 dan 626,61 µg/ml.

ABSTRACT

YENNI PINTAULI PASARIBU. *Exploration of Secondary Metabolites from Ethyl Acetate Extract of the Root Wood of *Kleinhovia hospita* Linn. (Paliasa) Plant and Their Bioactivities.* (supervised by Nunuk Hariani Soekamto dan Firdaus Zenta).

The need for safe drugs has been increasing nowadays. Medicinal plants has been widely used to treat various disease including cancer because it is relatively rare side effects. *Kleinhovia hospita* Linn. (paliasa) plant has been used as a traditional medicine and potential to be developed as phytopharmaca material. The purpose of this research is to determine the structure of secondary metabolites in the ethyl acetate extract of the root wood and their bioactivities against HeLa cell line.

Separation techniques used consisted of extraction, fractionation, and purification. The dried powder root wood was macerated with methanol and evaporated under reduced pressure to yield crude extract. The methanol extract was successively partitioned with n-hexane, chloroform and ethyl acetate. Ethyl acetate extract was fractionated by Vaccum Liquid Chromatography (VLC) and Flash Chromatography (FC) and recrystalized to yield pure compound. The structure of compounds were determined on the basis of spectroscopic evidence including IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT, HMQC, COSY, dan HMBC. Primary bioactivity was tested using Brine Shrimp Lethality Test (BST) method and the secondary bioactivity was determined against HeLa cell line.

Isolated compounds were alkaloid quinoline compound [I] and steroid [II] compound. The two compounds were non toxic against *A. salina* with LC_{50} 1511,77 dan 547,45 $\mu\text{g/ml}$ respectively and showed low activity against HeLa cell line with IC_{50} 429,54 and 626,61 $\mu\text{g/ml}$ respectively.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Tumbuhan tropis diyakini memiliki kemampuan menghasilkan beraneka ragam senyawa kimia alami yang mempunyai bioaktivitas tertentu baik sebagai pestisida, insektisida, antifungi, dan sitotoksik. Kemampuan tersebut salah satunya sebagai akibat mekanisme pertahanan diri terhadap ancaman di dalam kondisi lingkungan yang keras, baik karena faktor iklim maupun gangguan dari herbivora, serangga, dan berbagai hama penyakit (Wink, 2003).

Keanekaragaman tumbuhan tropis dunia merupakan sumber daya organik yang potensial untuk memperoleh kerangka molekul metabolit yang beraneka ragam. Sumber daya organik merupakan gudang senyawa kimia yang sangat potensial sebagai sumber senyawa baru yang tidak dapat ditemukan di laboratorium dan merupakan bahan yang sangat berguna untuk berbagai keperluan seperti obat-obatan, agrokimia, dan bahan baku industri (Achmad, 2007).

Indonesia memiliki hutan tropis yang cukup luas, tergolong sebagai negara *megabiodiversity* yang memiliki sekitar 54% spesies dari seluruh spesies tumbuhan tropis dunia, dan di dalamnya terkandung beraneka

ragam sumber daya genetik yang merupakan penyimpanan bahan-bahan kimia yang sangat prospektif untuk diteliti (Achmad, 2004).

Pengetahuan tradisional masyarakat Indonesia mengenai kegunaan tumbuhan tertentu untuk mengobati suatu penyakit pada umumnya diperoleh secara empiris. Pengetahuan ini apabila terbukti mujarab akan diteruskan kepada keturunannya (Ghosal *et al.*, 1986). Pengetahuan tradisional ini dapat dijadikan petunjuk untuk menemukan adanya bahan aktif yang terkandung di dalam tumbuhan. Contohnya apabila suatu jenis tumbuhan dapat menyembuhkan bisul atau penyakit kulit lainnya maka diduga bahwa tumbuhan tersebut mengandung antimikroba. Kemungkinan senyawa-senyawa tersebut juga akan memiliki aktivitas sebagai antijamur atau antibakteri yang dapat dimanfaatkan sebagai pestisida.

Penyakit kanker masih merupakan masalah kesehatan masyarakat yang penting baik di Indonesia maupun di berbagai negara karena masih tingginya angka kematian akibat kanker dan jumlah penderita yang meningkat tajam dari tahun ke tahun. Organisasi kesehatan dunia WHO menyatakan bahwa kanker merupakan penyebab utama kematian di dunia (sekitar 13% dari seluruh penyebab kematian). Pada tahun 2007 diperkirakan terdapat 7,9 juta kematian akibat kanker di dunia. WHO juga memperkirakan bahwa setiap tahun, sekitar 12 juta orang di dunia menderita kanker dan 7,6 juta di antaranya meninggal dunia. Jika hal ini tidak dikendalikan, diperkirakan tahun 2030 akan terdapat 26 juta

penderita kanker dan 17 juta kematian akibat kanker. Peristiwa ini akan terjadi lebih cepat di negara-negara miskin dan berkembang seperti Indonesia. Jenis kanker penyebab kematian antara pria dan wanita berbeda jenisnya, pada pria adalah kanker paru, lambung, hati, kolorektal, dan prostat; sedangkan pada wanita adalah kanker payudara, paru, lambung, kolorektal, dan serviks/ rahim (Jemal *et al.*, 2008).

Upaya pengembangan obat bahan alam ke arah fitofarmaka terus dilakukan. Beberapa obat antikanker yang berasal dari bahan alam telah ditemukan dan digunakan dalam terapi medis, misalnya alkaloid vinka (vinkristin dan vinblastin) untuk pengobatan leukemia, kanker ginjal ganas, dan neuroblastoma (Svoboda, 1961); paklitaxel (taxol) untuk pengobatan kanker rahim, payudara, dan paru-paru (Rowinsky dan Dorehower, 1995). Penelitian lain oleh Aryanti *et al.* (2005) menyimpulkan bahwa senyawa terpenoid dari akar berambut *Artemisia cina* aktif terhadap sel kanker HeLa Ohio dengan nilai IC_{50} 1 $\mu\text{g/ml}$. Penelitian lain yang dilakukan oleh Arung *et al.* (2009) menyimpulkan bahwa ekstrak metanol daun *K. hospita* menunjukkan aktivitas antioksidan dan sitotoksitas moderat terhadap sel kanker hati HepG2.

Famili Sterculiaceae merupakan salah satu tumbuhan tingkat tinggi yang tumbuh di hutan tropika. Beberapa spesies telah diteliti dan diketahui bahwa senyawa kimia yang lazim ditemukan pada tumbuhan ini terdiri atas beberapa golongan, antara lain terpenoid, fenil propanoid, flavonoid, turunan benzofuran, asam fenolat, dan oligomer stilbenoid (Atun, 2005).

Berdasarkan hasil survei etnobotani yang dilakukan, salah satu spesies dari famili Sterculiaceae yang sangat potensial untuk diteliti adalah *Kleinhovia hospita* Linn yang dikenal dengan nama kayu katimahar atau tumbuhan paliasa (Makassar). Tumbuhan ini tersebar luas di kepulauan Indonesia terutama di bagian timur Indonesia (Sulawesi, Maluku, dan Papua) serta di daerah Jawa dan Sumatera. Spesies *K. hospita* diyakini menghasilkan senyawa kimia metabolit sekunder yang memiliki bioaktivitas karena secara tradisional daunnya dimanfaatkan sebagai obat oleh masyarakat, khususnya di Sulawesi dipercaya berkhasiat sebagai obat penyakit liver, hipertensi, diabetes, dan kolesterol tinggi (Price dan Wilson, 1991).

Hasil survei yang dilakukan oleh Heyne (1987) menunjukkan bahwa daun *K. hospita* dapat mengobati iritasi mata dan digunakan sebagai bahan pencuci rambut. Penelitian lain dari Suryawati (1991) menyimpulkan bahwa ekstrak metanol dan ekstrak eter daun *K.hospita* mampu meningkatkan regenerasi sel-sel hati mencit, bahkan pada beberapa tempat diketahui bahwa tumbuhan tersebut digunakan sebagai penyembuh penyakit pneumonia dan penghilang kutu rambut (Latiff, 1997). Sebagai obat liver pada hewan telah dibuktikan bahwa ekstrak daun *K. hospita* pada dosis di bawah 1000 mg/kg berat badan secara efektif dapat mengurangi kerusakan hati tikus putih betina, strain wistar, yang diakibatkan oleh karbontetraklorida (CCl₄) (Raflizar *et al.*, 2006). Penelitian yang dilakukan oleh Arung *et al.* (2009) menyimpulkan

bahwa ekstrak metanol daun *K. hospita* menunjukkan aktivitas antioksidan dan sitotoksitas moderat terhadap sel kanker hati HepG2. Selain itu daun tumbuhan ini juga mempunyai efek antidiabetes dengan mekanisme penghambatan terhadap transpor aktif glukosa (Hasni, 2002).

Data yang paling menunjang dalam penelusuran bahan kimia obat dari *K. hospita* adalah skrining bioaktivitas jaringan tumbuhannya. Lima jaringan tumbuhan tersebut adalah daun, kulit batang, kayu batang, kulit akar, dan kayu akar yang telah diskruining melalui uji toksisitas terhadap udang *Artemia salina* Leach (BST). Kelima jaringan tersebut memiliki sifat toksisitas yang tinggi dengan tingkat letalitas berturut-turut : kayu batang dengan LC₅₀ 65,61 µg/ml; kayu akar dengan LC₅₀ 97,36 µg/ml; kulit batang dengan LC₅₀ 162,80 µg/ml; kulit akar dengan LC₅₀ 193,77 µg/ml; daun dengan LC₅₀ 230,19 µg/ml (Gaffar *et al.*, 2009).

Penelitian senyawa metabolit sekunder terhadap jaringan daun *K. hospita* telah dilakukan dan ditemukan 109 isolat dalam berbagai tingkat kepolaran. Isolat tersebut merupakan senyawa golongan terpenoid, steroid, dan fenolik (Noor dan Kumanireng, 2004). Sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Taebe (2004) telah berhasil mengidentifikasi adanya golongan senyawa flavonoid dan alkaloid.

Penelitian terhadap jaringan kulit batang tumbuhan *K. hospita* yang dilakukan oleh Dini (2005) berhasil menemukan senyawa β-sitosterol, golongan triterpenoid yang diduga sebagai lupeol, senyawa fenol yang diduga sebagai turunan stilben, turunan asam karboksilat, dan golongan

alkaloid. Selain itu Ulfa (2006) berhasil mengisolasi senyawa fenil propanoid dalam bentuk ester, golongan triterpenoid asam karboksilat, golongan alkaloid, dan golongan triterpenoid alkohol. Penelitian yang dilakukan oleh Soekamto *et al.* (2008) terhadap kulit batang *K. hospita* menemukan β -sitosterol, skopoletin, dan oleanen.

Penelitian tentang kayu batang tumbuhan *K. hospita* telah menemukan senyawa normonoterpenoid yang sangat aktif baik terhadap *A. salina* maupun sel tumor leukemia P-388 (Gaffar *et al.*, 2009). Sedangkan pada jaringan kulit akar tumbuhan *K. hospita* telah berhasil diisolasi senyawa-senyawa golongan terpenoid, fenol, β -sitosterol, asam butanoat (Ruhmah, 2008 dan Hasriani, 2008).

Penelusuran filogenetik tumbuhan *K. hospita* dapat dijadikan acuan untuk mengeksplorasi potensi kandungan kimia metabolit sekundernya. Pada akar tumbuhan *Melochia chamaedrys* (Sterculiaceae) telah diisolasi senyawa-senyawa kamaedrin, alkaloid peptida siklik, walterion A, asam parasorbat, propacin, dan (-)-epikatecin (Dias *et al.*, 2007). Pada bagian akar tumbuhan *Helicteres angustifolia* (Sterculiaceae) telah diisolasi senyawa-senyawa golongan triterpenoid, steroid, asam oleanolat, senyawa golongan naftakuinon (Wang dan Liu, 1987), dan senyawa golongan seskuiterpen kuinon (Chen *et al.*, 1990). Senyawa pregnan, kumarin, dan lupan juga telah berhasil diisolasi dari bagian akar tumbuhan ini yang menunjukkan aktivitas penghambatan signifikan terhadap pertumbuhan sel-sel karsinoma BEL-7402 dan sel-sel *in vitro* melanoma

SK-MEL-28 (Chen *et al.*, 2006). Penelitian terhadap akar *Helicteres isora* Linn telah menemukan cucurbitacin B and isocucurbitacin B yang memiliki aktivitas sitotoksik (Bean *et al.*, 1985). Selain itu dari akar tanaman *Ambroma augusta* telah ditemukan senyawa asam agustat (turunan oleanen) dan stigmasterol glikosida (Alam *et al.*, 1995).

Pelarut etil asetat telah banyak digunakan dalam penelitian bahan alam dan berhasil mengisolasi senyawa metabolit sekunder. Senyawa (-)-epi-katecin (flavonoid) telah diisolasi dari ekstrak etil asetat akar tumbuhan *M.chamaedrys* (Dias *et al.*, 2007). Pada ekstrak etil asetat biji tumbuhan *Sterculia lychnophora* (Pangdahai) berhasil diisolasi senyawa-senyawa alkaloid yaitu sterkulinin I dan sterkulinin II, glukopiranosil, kaempferol, urasil, dan asam suksinat, asam benzoat, daukosterol (Wang *et al.*, 2003). Pada ekstrak etil asetat kulit akar *Waltheria douradinha* (Sterculiaceae) telah ditemukan senyawa walterion A dan turunan orto metil yang mempunyai aktivitas antibakteri (Hoelzel *et al.*, 2005). Selain itu pada ekstrak etil asetat tangkai tumbuhan *Herrania cuatrecasana* telah berhasil diisolasi senyawa herrantrion (Wiedemann *et al.*, 1999).

Berdasarkan hasil penelusuran yang telah diuraikan di atas maka dapat dilakukan penelusuran metabolit sekunder pada salah satu jaringan tumbuhan *K. hospita* yaitu kayu akar dengan menggunakan pelarut etil asetat dan diuji bioaktivitasnya terhadap sel kanker rahim.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan penyelidikan etnobotani, filogenetik, dan kemotaksonomi maka dari ekstrak etil asetat kayu akar *K. hospita* dapat diperoleh suatu metabolit sekunder. Hal yang menjadi permasalahan adalah :

1. senyawa metabolit sekunder apa yang terdapat pada ekstrak etil asetat kayu akar *K. hospita*?
2. bagaimana tingkat bioaktivitasnya terhadap sel kanker rahim?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. mengisolasi dan menentukan struktur molekul metabolit sekunder pada ekstrak etil asetat kayu akar *K. hospita* dari wilayah Sulawesi Selatan.
2. menentukan bioaktivitas senyawa yang diperoleh terhadap sel kanker rahim.

D. Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat :

1. memberi informasi yang berharga tentang metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etil asetat kayu akar *K. hospita* dari wilayah Sulawesi Selatan dan bioaktivitasnya.

2. menjadi rujukan dalam pengembangan obat tradisional ke arah fitofarmaka dan pengembangan penggunaan senyawa-senyawa kimia dalam industri farmasi dan agrokimia.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

Indonesia adalah negara kepulauan yang memiliki hutan tropika terbesar kedua di dunia, kaya dengan keanekaragaman hayati dan dikenal sebagai negara *megabiodiversity* kedua setelah Brazilia. Distribusi tumbuhan tingkat tinggi yang terdapat di hutan tropika Indonesia lebih dari 12% atau sekitar 30.000 spesies dari 250.000 spesies yang ada di muka bumi (Achmad *et al.*, 2000).

Keanekaragaman hayati hutan tropika Indonesia dapat dipandang sebagai pabrik bahan kimia hayati yang memproduksi sepanjang tahun dan menjadi salah satu aset nasional dengan nilai ekonomis yang tinggi. Pemberdayaan dan penelitian kimiawi tumbuh-tumbuhan sebagai sumber utama model molekul-molekul bioaktif baru adalah salah satu alternatif yang dapat menjawab dan memecahkan permasalahan dalam bidang kesehatan (Ersam, 2004).

Penyelidikan etnobotani sebagai ilmu pengetahuan yang mempelajari kebiasaan kelompok masyarakat tradisional dalam memanfaatkan tumbuhan untuk mengobati penyakit tertentu telah banyak berperan dalam menemukan bahan-bahan kimia baru dan berguna dalam pengobatan (Ersam, 2004).

Sterculiaceae merupakan salah satu famili tumbuhan yang banyak digunakan sebagai tumbuhan obat.

A. Uraian Tentang Sterculiaceae

Sterculiaceae merupakan famili tumbuhan tropika dan subtropika yang terdiri atas 50 genus dan 700 spesies (Scogin, 1979). Sterculiaceae adalah pohon, perdu, semak, kebanyakan dengan rambut bintang. Daun tersebar atau berseling, tunggal atau majemuk menjari dengan daun penumpu. Bunga beraturan atau zygomorph, berkelamin satu atau dua. Daun kelopak lima, lepas atau melekat jadi tiang, yang mendukung benang sari dan bakal buah. Staminodia 5 atau tidak ada (Steenis *et al.*, 1972).

Tumbuhan Sterculiaceae telah lama dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai obat tradisional, misalnya kayu batang *H. cuatrecasana* disuspensikan dalam air penawar gigitan ular, dan kulit batangnya disuspensikan dalam alkohol untuk digunakan sebagai obat iritasi tenggorokan dan batuk kering (Wiedemann *et al.*, 1999). Daun *Sterculia africana* digunakan sebagai obat kejang-kejang (Hamza *et al.*, 2006). Akar *Helicteres* digunakan untuk mengobati radang ginjal kronik dan buahnya digunakan sebagai jamu untuk membasmi cacing pita (Kamiya *et al.*, 2001). Akar dan kulit batang *H. isora* digunakan pada pengobatan kolik, skabies, gastropati, diabetes, diare, dan disentri (Prajapathi *et al.*, 2003). Daun *Pterospermum acerifolium* yang telah dilayukan di atas api dapat menghilangkan gatal pada kaki akibat terbenam dalam lumpur (Heyne, 1987).

Penelusuran etnobotani pada spesies Sterculiaceae membuktikan adanya aktivitas biologis (etnofarmakologi) dari beberapa ekstrak tumbuhan. Beberapa spesies yang telah diketahui aktivitas biologisnya dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Spesies-spesies dari Sterculiaceae dan aktivitas biologisnya

Spesies [Lokasi Sampling]	Aktivitas Biologis
<i>Cola greenwayi</i> [Kwazulu-Natal (Afrika Selatan)]	Daun dan ranting (ekstrak CH ₂ Cl ₂ dan etanol) → antiinflamasi (menghambat COX-1) {Reid <i>et al.</i> , 2005}
<i>Dombeya burgessiae</i> [Kwazulu-Natal (Afrika Selatan)]	Daun dan ranting (ekstrak CH ₂ Cl ₂ dan etanol) → antiinflamasi (menghambat COX-1 dalam sintesis prostaglandin) {Reid <i>et al.</i> , 2005}
<i>Guazuma ulmifolia</i> Lam. [Pichincha (Ekuador)]	Daun dan bunga (ekstrak etanol) → antiinflamasi (pada tikus Wistar jantan dan betina) {Berenguer <i>et al.</i> , 2007}
<i>Helicteres gardneriana</i> [Gresso de Sul & Sao Paulo (Brazil)]	Ujung ranting (ekstrak etanol) → antiparasit terhadap <i>Leishmania braziliensis</i> (parasit yang menimbulkan noda pada kulit dan selaput lendir) {Truiti <i>et al.</i> , 2005}
<i>Helicteres isora</i> [Tamil Nadu dan Andhra Pradesh (India), Jawa (Indonesia)]	Batang (ekstrak H ₂ O) → antidiabetes (penurunan kadar glukosa darah pada tikus Wistar albino jantan) {Kumar <i>et al.</i> , 2006}; Akar (ekstrak etanol) → antidiabetes dan efek hipolipidemik (pengurangan kadar glukosa plasma, trigliserida, dan insulin pada tikus C57BL/KsJdb/db) {Chakrabarti <i>et al.</i> , 2002}
<i>Helicteres angustifolia</i> [Taichung Hsein, Taiwan]	Akar dan batang (ekstrak metanol) → analgesik, antiinflamasi, antibakteri, dan antitumor {Chang, <i>et al.</i> , 2001}
<i>Kleinhovia hospita</i> Linn. [Sulawesi Selatan, Indonesia]	Daun (ekstrak alkohol) → anti radang hati (pada tikus betina Strain Wistar akibat CCl ₄) {Raflizar <i>et al.</i> , 2006}; Infus daun → anti hipertensi (pada kelinci) [Herlina, 1993], anti-diabetes (penghambatan terhadap transport aktif glukosa pada usus halus marmot) {Hasni, 2002}; Kambium batang → antitumor (dalam sarcoma mencit) {Latiff, 1997}.
<i>Melochia arenosa</i> Benth. [Gresso de Sul dan Sao Paulo (Brazil)]	Ujung ranting (ekstrak etanol) → antiparasit terhadap <i>Trypanosoma cruzi</i> (menyebabkan sindrom gila) {Truiti <i>et al.</i> , 2005}.

B. Uraian Tentang *Kleinhovia hospita* Linn

K. hospita merupakan salah satu tumbuhan tropika yang banyak ditemukan di daerah Sulawesi Selatan dan tersebar luas di beberapa pulau di Indonesia. *K. hospita* merupakan satu-satunya spesies Sterculiaceae yang termasuk dalam genus *Kleinhovia*. Spesies ini dikenal dengan nama kayu katimahar, namun dikenal oleh masyarakat dengan nama yang berbeda-beda, seperti di Sunda dikenal dengan nama tangkele, tangkolo; di Jawa dikenal dengan nama kayu tahun, katimaha, katimanga; di Bali dikenal dengan nama katimahan; di Flores dikenal sebagai kadanga; di Sulawesi Utara dikenal sebagai bintanga; di Ambon dikenal dengan nama kinar; di Makassar dikenal sebagai kayu paliasa, kauwasa, dan di Bugis dikenal dengan nama aju pali (Heyne, 1987).

1. Taksonomi Tumbuhan

Taksonomi tumbuhan *K.hospita* menurut USDA-NRDCS (2000) adalah :

Kingdom : Plantae
 Divisi : Spermathophyta
 Kelas : Dicotyledonae
 Ordo : Malvales
 Suku : Sterculiaceae
 Genus : *Kleinhovia*
 Spesies : *Kleinhovia hospita* Linn



2. Morfologi Tumbuhan

K. hospita tumbuh secara liar atau sebagai tanaman hias pada ketinggian kurang dari 500 meter di atas permukaan laut, terutama di tepi air dan tempat lembab, serta mampu bertahan hidup pada kemarau atau kekeringan. Pohon ini merupakan pohon yang tumbuh cepat dan dapat mencapai ketinggian 18-20 m serta besar batang 70-90 cm, kadang-kadang mencapai 100 cm. Tumbuhan ini banyak ditanam sebagai pagar-pagar hidup sebab setek – seteknyapun mudah tumbuh (Heyne, 1987).

Batang *K. hospita* berbonggol-bonggol pendek dan dipenuhi cabang. Kayunya liat dan padat, berwarna pucat dan pada pohon yang tua warnanya kekuning-kuningan dengan urat-urat hitam (Heyne, 1987).

Daun *K. hospita* bertangkai panjang, berbentuk jantung lebar, berukuran panjang 4,5 – 27 dan lebar 3 – 24 cm. Pangkal daun bertulang menjari. Bunga dalam malai di ujung, lebar, berambut halus dengan daun pelindung berbentuk oval. Tajuk kelopak 5 berbentuk lanset dengan panjang 6 – 10 mm berwarna merah keunguan, dari luar berbentuk bintang. Daun mahkota berjumlah 5, empat di antaranya berbentuk pita lebar dengan pangkal lebih kurang berbentuk kantong, panjang 6 mm, berwarna merah sedangkan daun mahkota kelima lebih pendek berbentuk oval melintang dengan tepi terlipat ke dalam.

Dasar bunga diperpanjang menjadi tiang tipis yang pangkalnya dikelilingi oleh tonjolan dasar bunga yang berbentuk cawan. Benang sari tersusun dalam 5 berkas dengan tiap berkas berjumlah tiga helai. Kepala

sari tertancap sebagai perisai. Bakal buah beruang lima, tangkai putik satu, buah berbentuk pir, menggelembung seperti selaput, bersudut lima, panjang lebih kurang 2 cm, dan membuka menurut ruang (Steenis, 1975).

3. Khasiat

Pemakaian tumbuhan *K.hospita* sebagai obat tradisional telah lama digunakan oleh masyarakat Indonesia. Masyarakat di Ambon memakai daunnya yang muda untuk mencuci rambut. Air rendaman daunnya digunakan untuk mencuci mata bila penglihatan memburuk (Heyne, 1987). Perkembangan yang pesat ini perlu didukung oleh pembuktian secara alamiah terutama mengenai khasiat, mutu, dan keamanan obat tradisional sebagai obat fitofarmaka.

Berdasarkan survei etnobotani, daun *K. hospita* dimanfaatkan masyarakat Indonesia dan negara tetangga Malaysia sebagai obat tradisional untuk menghilangkan kudis dan untuk pengobatan penyakit hati, penyakit kuning, hepatitis, kolesterol tinggi, gula, dan hipertensi (Price dan Wilson, 1991).

Ekstrak metanol daun *K. hospita* memiliki pengaruh terhadap regenerasi sel-sel hati mencit. Hasil pengamatan histologik terhadap jaringan hati mencit menunjukkan bahwa ekstrak metanol dengan konsentrasi 10 % dan 15 % b/v daun kayu *K. hospita* dapat meningkatkan daya regenerasi sel-sel hati mencit (Nurhaedah, 1993).

Penelitian isolasi senyawa metabolit sekunder dari ekstrak *n*-heksan kulit akar *K. hospita* yang dilakukan oleh Ruhmah (2008)

menghasilkan senyawa asam 4-(3-hidroksiandrostanil)2-hidroksimetil-4,4-dimetil butanoat) yang bersifat toksik terhadap *A. salina* dengan LC_{50} 43,87 $\mu\text{g/ml}$. Hal ini membuktikan adanya kandungan metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antikanker dalam ekstrak *n*-heksan kulit akar tumbuhan *K. hospita*, khususnya senyawa steroid. Senyawa lain yang ditemukan adalah β -sitosterol yang mampu menghambat kerja enzim yang mengkonversi testosteron menjadi dehidrotosteron (DHT) yang merupakan penyebab terjadinya kanker prostat (Ruhmah, 2008). Selain itu β -sitosterol merupakan senyawa yang efektif digunakan dalam penyembuhan penyakit asma, sehingga memungkinkan senyawa ini untuk dikembangkan sebagai obat terapi penyakit alergi (Yuk, 2007).

Penelitian lainnya menyebutkan bahwa ekstrak metanol daun *K. hospita* menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi (96%) jika dibandingkan dengan vitamin C (98%) melalui metode DPPH dan aktivitas untuk fraksi-fraksi *n*-heksan, dietil eter, dan etil asetat berturut-turut adalah 48,9%, 74%, dan 84,3% (Arung *et al.*, 2009). Selain itu ekstrak metanol daun ini menunjukkan sitotoksisitas moderat terhadap sel kanker hati HepG2 yaitu 14% pada konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$, 76% pada konsentrasi 87,5 $\mu\text{g/ml}$, dan 80% pada konsentrasi 125 $\mu\text{g/ml}$ (Arung *et al.*, 2009).

Pemakaian tumbuhan *K. hospita* sebagai obat tradisional tersebar hampir di seluruh nusantara terutama di daerah Sulawesi Selatan, Maluku, dan Ternate. Kambium pohonnya digunakan untuk mengobati

pneumonia (Latiff *et al.*, 1997). Oleh karena tumbuhan ini memiliki banyak keistimewaan seperti yang telah diuraikan di atas, banyak penelitian telah dilakukan terhadap tumbuhan ini walaupun masih terbatas pada jaringan daun dan batangnya. Penelitian farmakologi tumbuhan ini telah membuktikan beberapa aktivitas biologis dari ekstrak tumbuhannya; antara lain anti-radang hati, antihipertensi, antidiabetes dan antitumor.

C. Fitokimia Tumbuhan Sterculiaceae

Berdasarkan kandungan kimia yang berhasil diisolasi dan diidentifikasi dari tumbuhan famili Sterculiaceae termasuk *K. hospita* dapat digambarkan fitokimianya dalam beberapa golongan sebagai berikut:

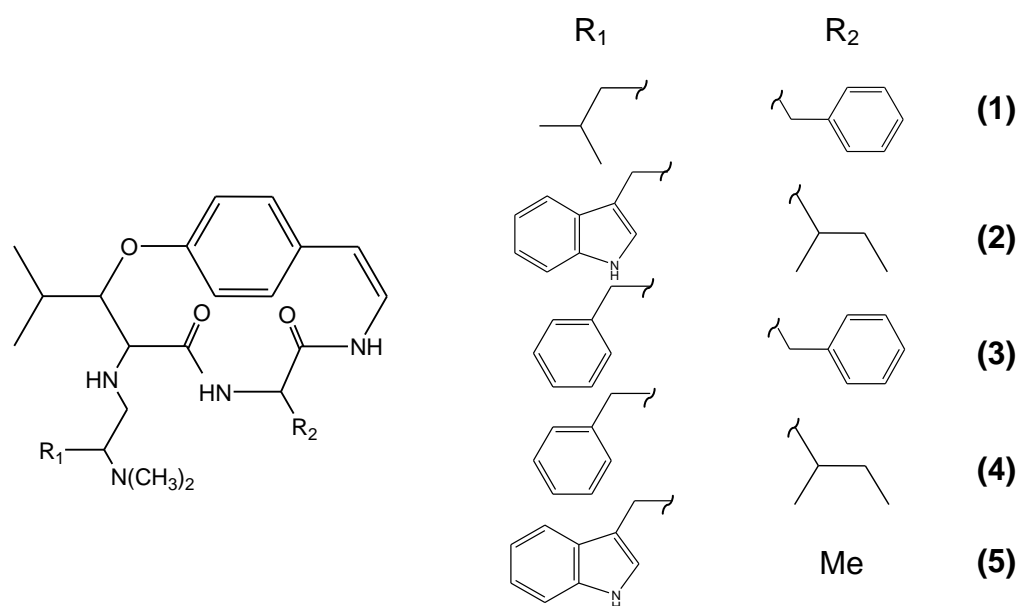
1. Alkaloid

Alkaloid termasuk metabolit sekunder dengan populasi terbesar terutama pada tumbuh-tumbuhan. Senyawa alkaloid mengandung sedikitnya satu unsur nitrogen dan umumnya berbentuk heterosiklik. Berdasarkan jenis cincin heterosikliknya, alkaloid dikelompokkan sebagai alkaloid pirol, alkaloid kuinon, alkaloid indol, alkaloid siklopeptida, alkaloid fenil alanin dan steroidal alkaloid (Usman, 2002).

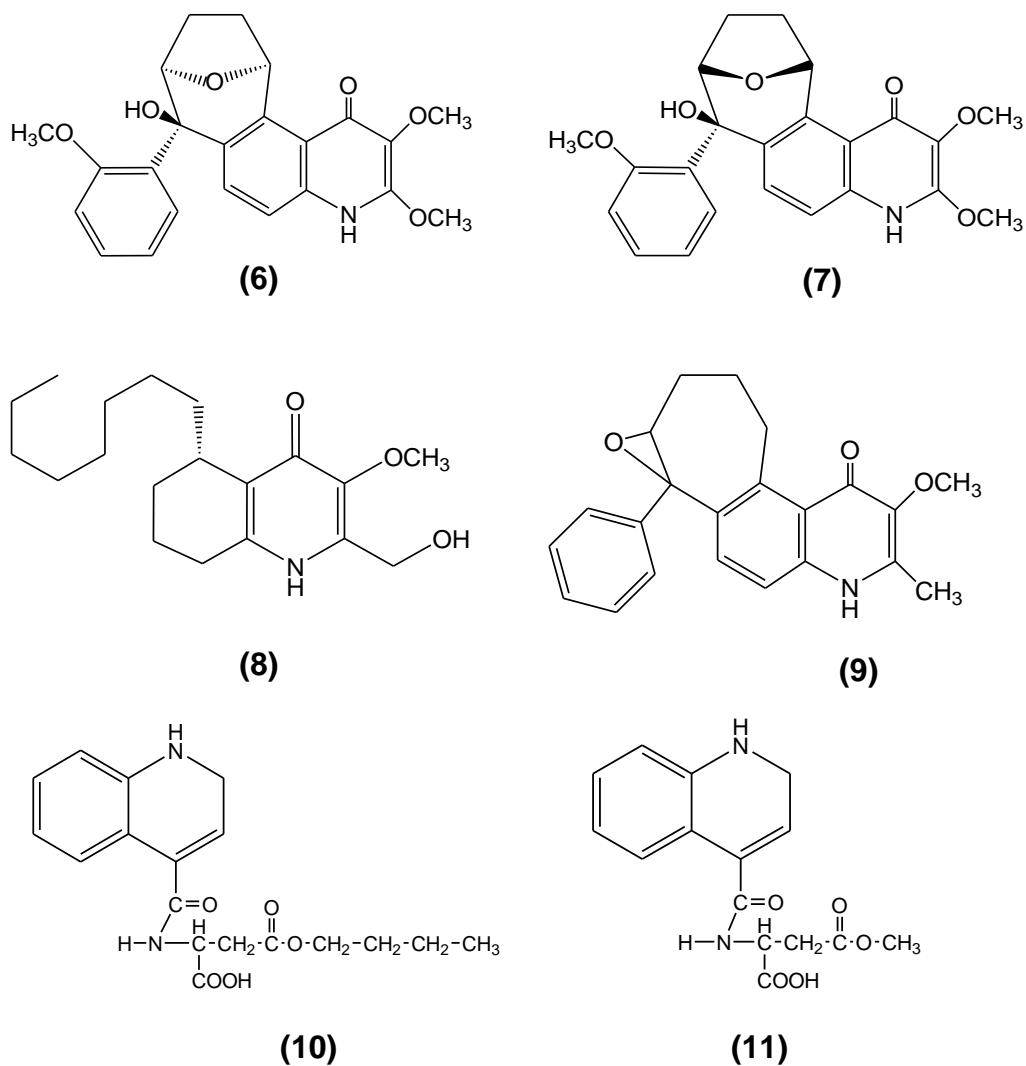
Tumbuhan famili Sterculiaceae mengandung beragam senyawa alkaloid, di antaranya adalah lima jenis alkaloid siklopeptida yang strukturnya diperlihatkan dalam Gambar 1, yaitu walterin-A (**1**), walterin-B (**2**), skutianin-B (**3**), adouetin-Y' (**5**), dan walterin-C yang diisolasi dari ekstrak metanol batang *Waltheria douradinha* (Morel *et al.*, 1999).

Senyawa **(3)** juga berhasil diisolasi dari ekstrak kloroform akar *Melochia chamaedrys* (Dias *et al.*, 2007).

Senyawa jenis alkaloid kuinolin (Gambar 2) juga telah ditemukan pada tumbuhan Sterculiaceae, yaitu walterion A **(6)**, walterion B **(7)**, dan vanessin **(8)** yang diisolasi dari ekstrak *n*-heksan kulit batang *W.douradinha* (Gressler *et al.*, 2008). Senyawa **(6)** juga diperoleh dari ekstrak EtOAc kulit akar *W.douradinha* (Hoelzel *et al.*, 2005) dan ekstrak kloroform akar *M. chamaedrys* (Dias *et al.*, 2007). Senyawa 7,8-epoksi-melochinon **(9)** telah diisolasi dari ekstrak EtOAc kayu batang *Melochia umbellata* (Houtt.) Stapf var.degrabrata K (Erwin, 2010). Selain itu senyawa alkaloid sterkulinin I **(10)** dan sterkulinin II **(11)** telah diisolasi dari ekstrak EtOAc biji *Sterculia lychnophora* (Wang *et al.*, 2003).



Gambar 1. Senyawa alkaloid dari tumbuhan Sterculiaceae

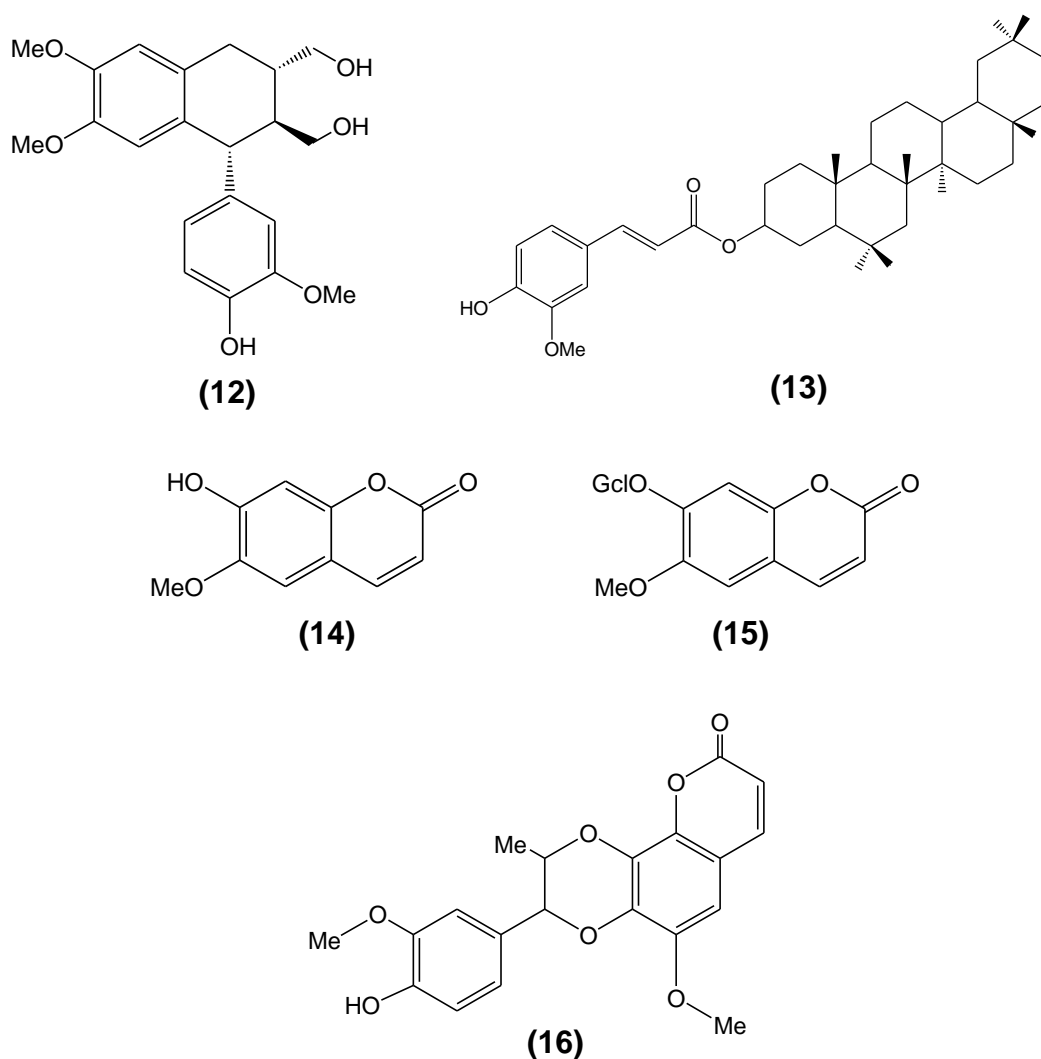


Gambar 2. Senyawa alkaloid dari tumbuhan Sterculiaceae

2. Fenilpropanoid

Fenilpropanoid adalah senyawa fenol yang mempunyai cincin aromatik dengan rantai samping terdiri atas tiga atom karbon. Berdasarkan kerangka dasarnya, kelompok senyawa ini dibedakan menjadi beberapa jenis, yaitu turunan sinamat, alilfenol, lignin, dan kumarin.

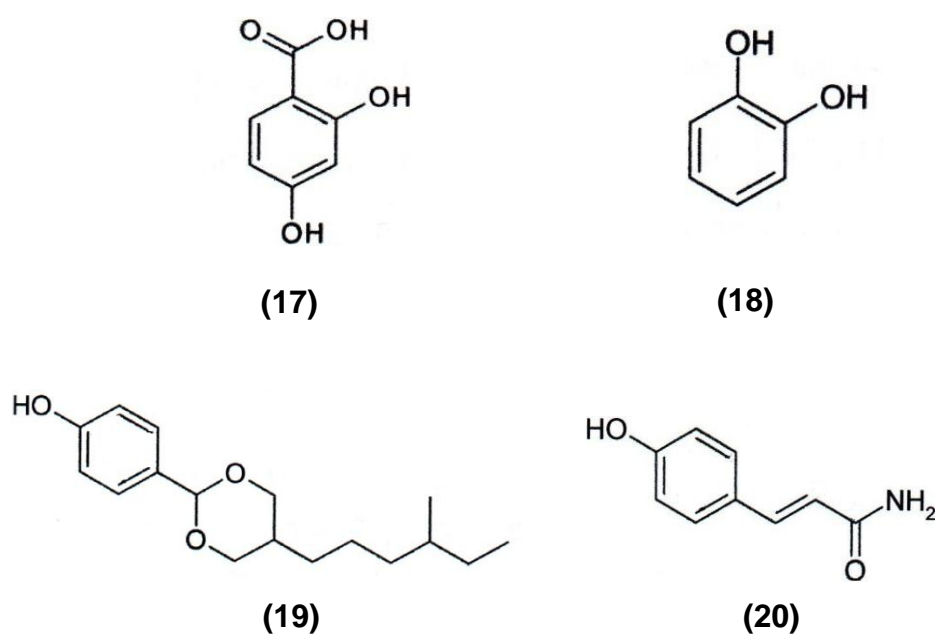
Senyawa-senyawa fenilpropanoid yang ditemukan dari famili Sterculiaceae di antaranya adalah skafopetalon **(12)**, skafopetalumat **(13)**, skopoletin **(14)**, dan skopolin **(15)** (Gambar 3). Keempat senyawa ini diisolasi dari ekstrak metanol kayu batang *Scaphopetalum thonneri* (Vardamides *et al.*, 2003). Selain itu dari ekstrak kloroform akar tumbuhan *M. chamaedrys* telah diisolasi senyawa turunan kumarinolignoid yaitu propacin **(16)** (Dias *et al.*, 2007).



Gambar 3. Senyawa fenilpropanoid dari tumbuhan Sterculiaceae

3. Fenol dan Asam Fenolat

Senyawa fenol mempunyai ciri khas cincin aromatik yang mengandung satu atau lebih substituen hidroksil. Senyawa fenol dan asam fenolat yang terdapat pada tumbuhan Sterculiaceae di antaranya adalah asam 2,4-dihidroksibenzoat **(17)** yang diisolasi dari ekstrak sikloheksan biji *S. lychnophora* (Wang *et al.*, 2003) dan senyawa catechol **(18)** (Gambar 4) yang diisolasi dari biji *Cola nitida* dan *C. acuminata* (Hutchings *et al.*, 1996). Senyawa fenol lain telah diisolasi dari ekstrak EtOAc tumbuhan *K. hospita* yakni geranyl-1",3"-diokso-para-kresol **(19)** dan 4-hidroksinamida **(20)** (Ilyas, 2008).



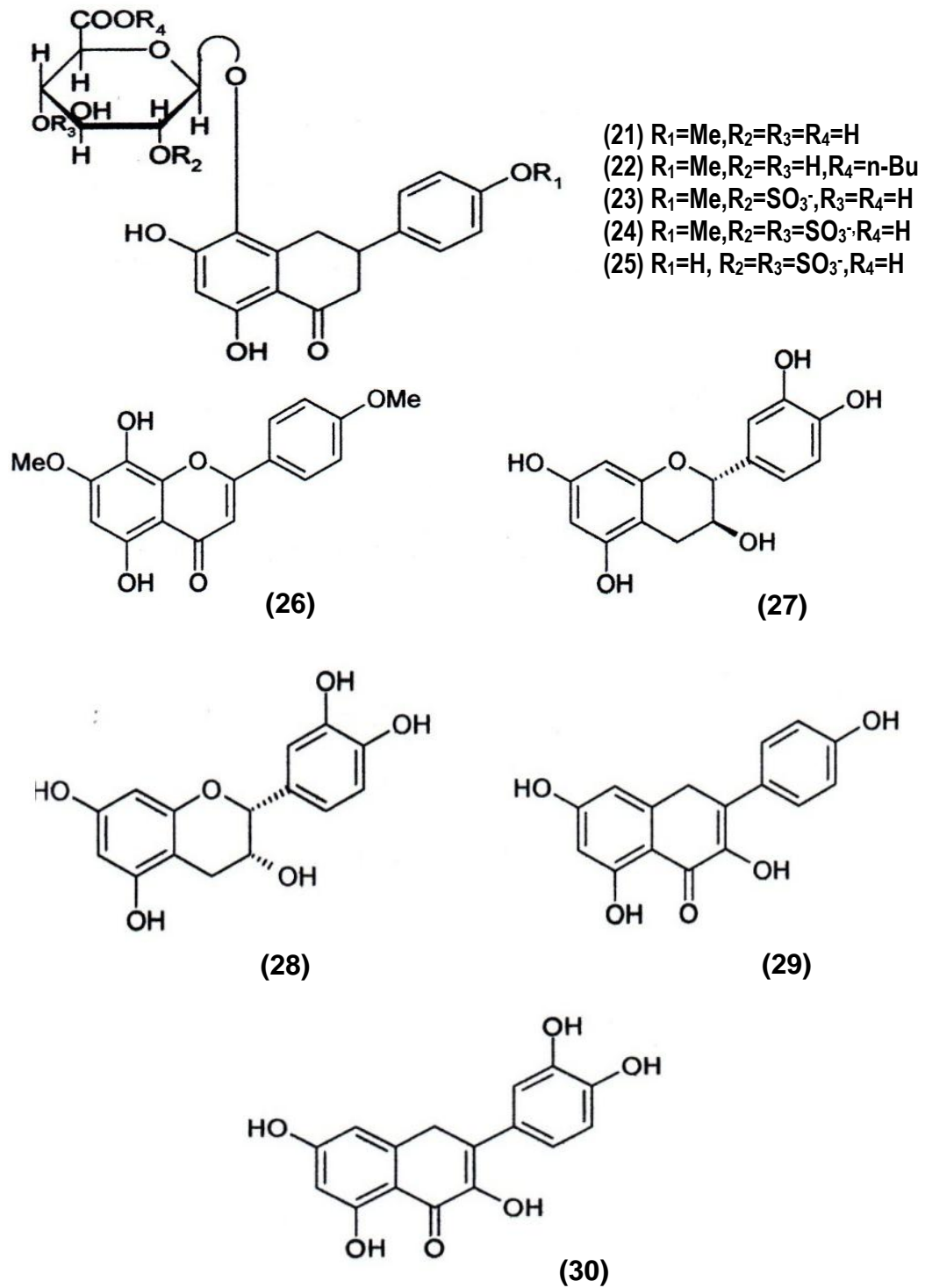
Gambar 4. Senyawa fenol dan asam fenolat

4. Flavonoid

Flavonoid adalah senyawa metabolit sekunder yang mempunyai berbagai fungsi fisiologi, biokimia, dan ekologi seperti terhadap sinar ultraviolet, interaksi antar spesies, sebagai zat warna pada bunga, dan sebagai zat yang berfungsi untuk pertahanan pada tumbuhan (Marthens dan Mithofer, 2005). Senyawa-senyawa flavonoid yang diisolasi dari berbagai tumbuhan mempunyai keaktifan sebagai antimikroba, antijamur, obat infeksi pada luka, mengurangi pembekuan darah di dalam tubuh, mempercepat pembekuan darah di luar tubuh, antikanker, dan antitumor (Usman, 2002).

Senyawa golongan flavonoid yang telah diisolasi dari tumbuhan Sterculiaceae di antaranya adalah lima senyawa golongan flavonoid yang diisolasi dari buah *H. isora*, yakni isoskutellarin 4'-metil eter 8-O- β -D-glukuronida (**21**) dan isoskutellarin 4'-metil eter 8-O- β -D-glukuronida 6"-n-butyl ester (**22**) yang diisolasi dari ekstrak butanol, serta senyawa isoskutellarin 4'-metil eter 8-O- β -D-glukuronida 2",4"-disulfat (**23**) sedangkan isoskutellarein 4'-metil eter 8-O- β -D-glukuronida 2",4"-disulfat (**24**) dan isoskutellarin 8-O- β -D-glukuronida (**25**) dalam ekstrak H₂O (Kamiya *et al.*, 2001). Flavonoid sederhana juga telah banyak ditemukan pada tumbuhan Sterculiaceae, misalnya 5,8-dihidroksi-7,4'-dimetoksi flavon (**26**) dari ekstrak *n*-butanol akar *H. angustifolia* (Chen *et al.*, 2006); katecin (**27**) dan (-)epi-katecin (**28**) dari ekstrak EtOAc biji *Theobroma cacao* (Porter *et al.*, 1991) dan akar *M. chamaedrys* (Dias *et al.*, 2007)

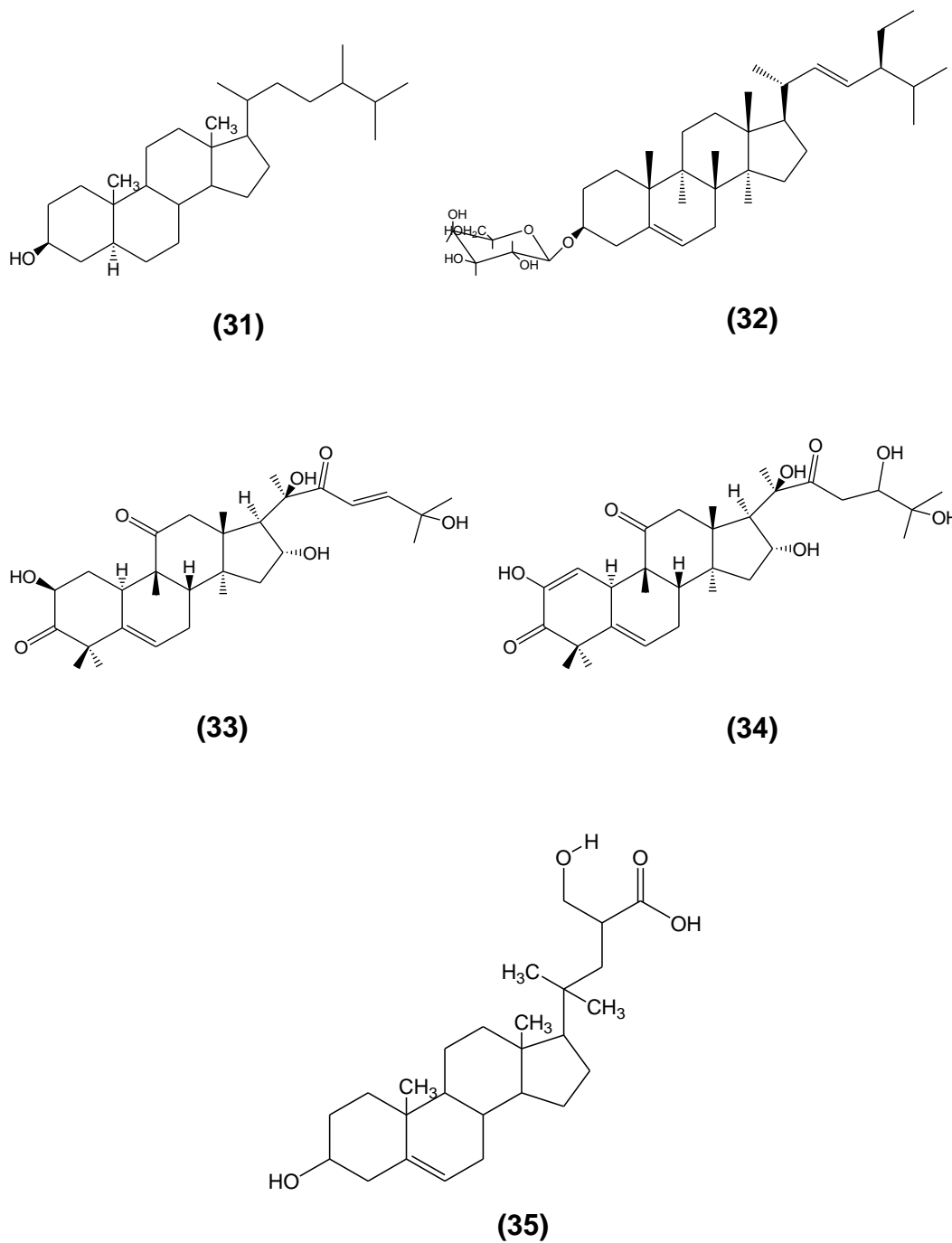
serta kaemferol **(29)** dan quercetin **(30)** (Gambar 6) dari bunga *G. ulmifolia* (Lyu *et al.*, 2005) dan daun *K. paliasa* (Latiff, 1997).



Gambar 5. Senyawa flavonoid dari tumbuhan Sterculiaceae

5. Steroid

Senyawa steroid merupakan senyawa organik bahan alam yang dihasilkan oleh mikroorganisme melalui metabolisme sekunder. Steroid adalah senyawa turunan dari terpenoid yang tidak terhidrolisis. Steroid merupakan kelompok senyawa yang penting dengan struktur dasar sterana dan gonana jenuh dengan nama 1,2-siklopentano-perhidrofenantren. Steroid mempunyai struktur dasar yang terdiri atas 17 atom karbon yang membentuk 3 cincin sikloheksana dan 1 cincin siklopentana. Kerangka ini sekaligus merupakan ciri-ciri khusus steroid yang membedakannya dengan senyawa organik bahan alam lainnya. Berbagai jenis hormon, asam empedu, dan senyawa-senyawa anabolit merupakan turunan steroid. Senyawa steroid dari famili Sterculiaceae diantaranya adalah β -sitosterol **(31)** (Gambar 6) yang diisolasi dari ekstrak sikloheksan biji *S. lychnophora* (Wang *et al.*, 2003), ekstrak kloroform akar *H. angustifolia* (Chen *et al.*, 2006), ditemukan pula pada kulit batang *K. hospita* dalam ekstrak *n*-heksan dan kloroform (Dini, 2005; Ulfa, 2006), serta ditemukan pada jaringan kayu batang *K. hospita* (Gaffar, 2009); stigmasterol glikosida **(32)** dari ekstrak EtOAc akar *A. augusta* (Alam *et al.*, 1995); cucurbitacin D **(33)** dan cucurbitacin J **(34)** dari ekstrak kloroform ujung ranting *H. angustifolia* (Chen *et al.*, 2006). Senyawa steroid lainnya juga berhasil diisolasi kulit akar *K. hospita* dalam ekstrak *n*-heksan yakni asam 4-(3-hidroksiandrostanil)-2-hidroksimetil-4,4-dimetil-butanoat **(35)** (Ruhmah, 2008).

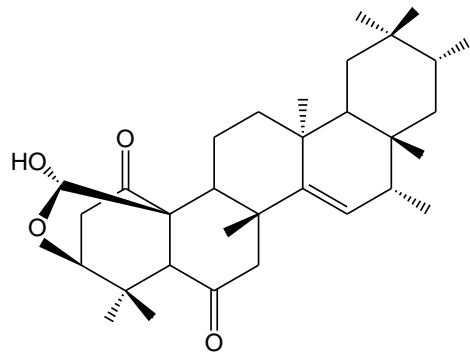


Gambar 6. Senyawa steroid dari tumbuhan Sterculiaceae

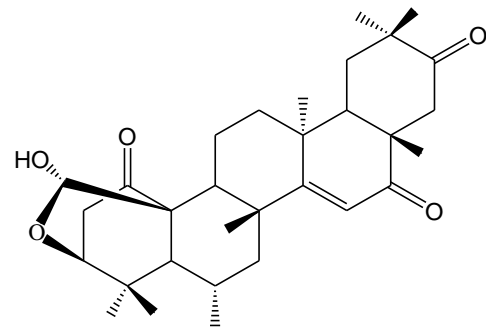
6. Terpenoid

Terpenoid adalah senyawa organik bahan alam yang tersebar secara meluas dalam makhluk hidup. Senyawa ini dibedakan berdasarkan model kerangka dan jumlah unit isoprennya. Senyawa golongan ini diketahui mempunyai manfaat farmakologis, misalnya sebagai antiseptik, penenang, pencegah peradangan, antitumor, antibakteri dan sebagainya.

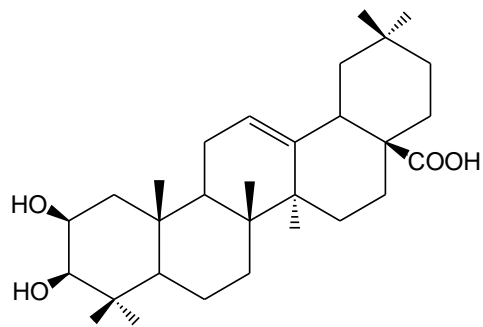
Senyawa golongan terpenoid yang telah ditemukan pada famili Sterculiaceae adalah *herranon* (**36**) dan *herrantrion* (**37**) (Gambar 7), merupakan triterpen tipe tarakseren yang diisolasi dari kayu batang *H. cuatrecasana* masing-masing dalam ekstrak *n*-heksan dan EtOAc (Wiedemann *et al.*, 1999). Jenis triterpen lainnya adalah asam 2,3-dihidroksi-12-oleanen-28-oat atau biasa disebut sebagai asam agustat (**38**) yang diisolasi dari ekstrak EtOAc akar *A. augusta* (Alam *et al.*, 1995) dan dari kulit batang tumbuhan *K. hospita* (Soekamto *et al.*, 2008); asam oleanolat (**39**) yaitu triterpen pentasiklik yang diisolasi dari ekstrak metanol kayu batang *S. thonneri* (Vardamides *et al.*, 2003) dan ekstrak kloroform akar *H. angustifolia* (Chen *et al.*, 2006); asam 3-hidroksi-12-oleanen-28-oat (**40**) yang berhasil diisolasi dari ekstrak kloroform kulit akar tumbuhan *K. hospita* (Purwaningsih, 2010); dan asam 3-asetoksi-12-oleanen-28-oat (**41**) yang diisolasi dari ekstrak kayu batang tumbuhan *K. hospita* (Gaffar, 2009).



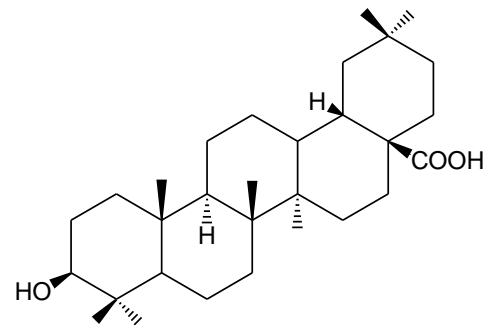
(36)



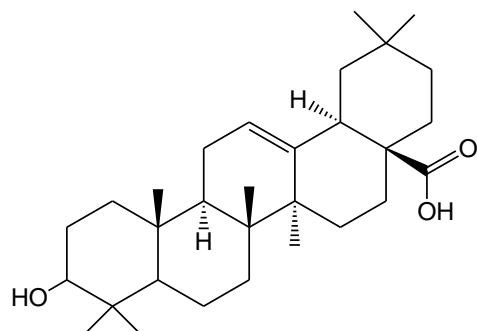
(37)



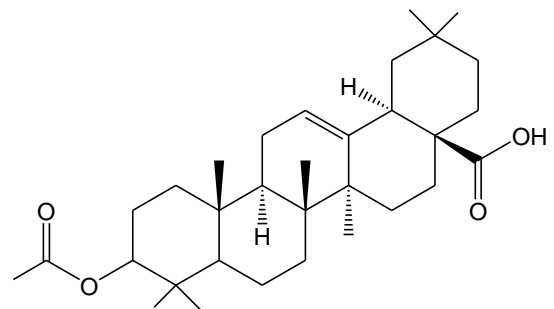
(38)



(39)



(40)



(41)

Gambar 7. Senyawa terpenoid dari tumbuhan Sterculiaceae

D. Bioaktivitas

1. Uji Bioaktivitas

Uji bioaktivitas primer yang lazim digunakan pada ekstrak maupun senyawa-senyawa murni bahan alam adalah “*Brine Shrimp Lethality Test (BST)*”. Uji bioaktivitas ini dilakukan terhadap benur udang *A. salina*. BST merupakan uji bioaktivitas yang mempunyai korelasi positif dengan uji-uji sekunder seperti antitumor sel leukemia P-388 maupun antikanker. Penggunaan *A. salina* dalam uji bioaktivitas merupakan uji letalitas sebagai indikator untuk uji sitotoksik dan sangat baik pula untuk evaluasi secara cepat dari hasil ekstraksi kimia bahan alam yang mengandung senyawa bioaktif (Meyer *et al.*, 1982).

Bioaktivitas ekstrak dan isolat bahan alam ditentukan dengan LC_{50} yang menggunakan *Bliss Method*. Nilai LC_{50} merupakan nilai konsentrasi sampel yang menyebabkan 50% kematian pada hewan uji (Anonim, 2004). Senyawa murni digolongkan tidak aktif (non toksik) jika memiliki nilai LC_{50} lebih dari 200 $\mu\text{g/ml}$, sedangkan ekstrak lebih dari 500 $\mu\text{g/ml}$ terhadap *A. salina*. Ekstrak atau senyawa yang tergolong aktif (toksik) terbagi menjadi 2 kategori, yaitu toksisitas tinggi untuk $LC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$ dan toksisitas rendah untuk $LC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$ (Anderson *et al.*, 1990).

Uji bioaktivitas menggunakan *A. salina* telah lama dikembangkan. Metode ini kemudian dikembangkan dalam skrining bioaktivitas ekstrak dari 41 spesies *Euphorbiaceae* terhadap *A. salina* maupun sel leukemia P-388. Dari sejumlah spesies tersebut terdapat 24 ekstrak yang bersifat

sitotoksik terhadap sel leukemia P-388 dengan $IC_{50} \leq 30 \mu\text{g/ml}$; dan dari 24 ekstrak bioaktif tersebut terdapat 14 ekstrak yang bersifat toksik terhadap *A. salina*. Oleh sebab itu kedua metode tersebut mempunyai hubungan bioaktivitas dan dapat dikatakan bahwa senyawa-senyawa yang menunjukkan bioaktivitas terhadap *A. salina* juga menunjukkan bioaktivitas terhadap sel leukemia P-388 (Meyer *et al.*, 1982).

Salah satu kultur sel mamalia yang sering digunakan dalam pengujian aktivitas antikanker secara *in vitro* adalah sel HeLa. Sel HeLa merupakan *continuous cell line* yang tumbuh sebagai sel semi melekat. HeLa *cell line* ini diturunkan dari sel epitel kanker leher rahim (cervix) manusia. Metode yang digunakan adalah MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheniltetrazolium bromide]. Metode ini merupakan metode kolorimetrik, yang mana pereaksi MTT merupakan garam tetazolium yang dapat dipecah menjadi kristal formazan oleh sistem suksinat tetrazolium reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel yang aktif pada sel yang masih hidup. Kristal formazan ini memberi warna ungu yang absorbansinya dapat dibaca menggunakan ELISA *reader* (Doyle dan Griffiths, 2000).

2. Bioktivitas Antikanker Tumbuhan Sterculiaceae

Kanker merupakan neoplasma yang sifatnya ganas dengan karakteristik satu atau sekumpulan sel mengalami pertumbuhan abnormal dan tidak dapat dikendalikan sehingga mampu merusak struktur di

dekatnya dan menyebar ke tempat yang jauh (metastasis) serta menyebabkan kematian.

Senyawa-senyawa metabolit sekunder yang ditemukan pada tumbuhan Sterculiaceae memiliki potensi sebagai senyawa antikanker yang terbukti melalui uji bioaktivitas (Tabel 2).

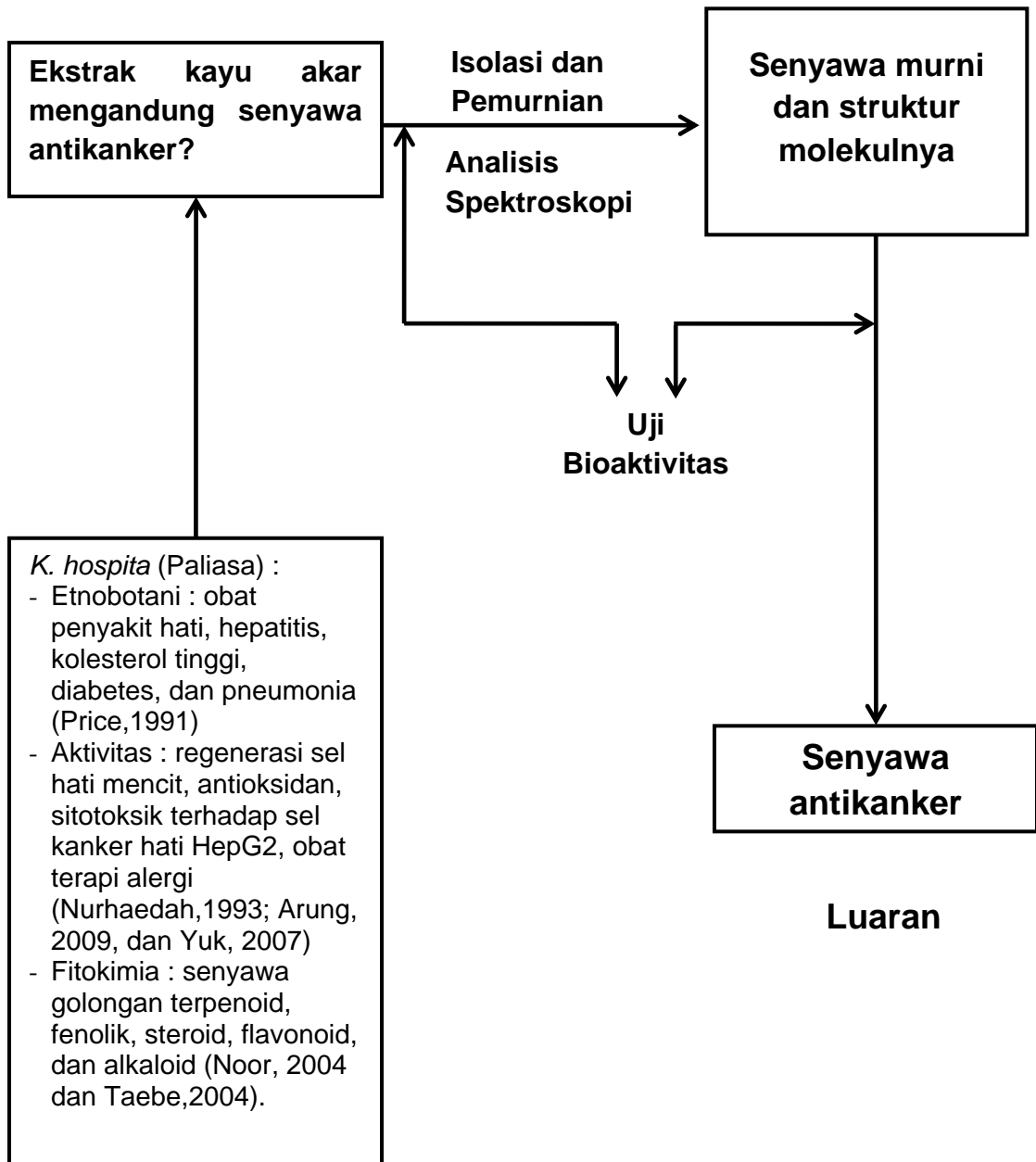
Tabel 2. Bioktivitas Antikanker Tumbuhan Sterculiaceae

Nama senyawa	Asal Tumbuhan	Bioaktivitas
Asam 3 β -hidroksi-27-benzoiloksilup-20(29)-en-28-oat	<i>H. angustifolia</i>	Sitotoksik [pada sel melanoma malignan (SK-MEL-28 <i>cell line</i>), IC ₅₀ 20,5 μ M] (Chen <i>et al.</i> , 2006).
Asam helikteret	<i>H. angustifolia</i>	Sitotoksik [pada sel melanoma malignan (SK-MEL-28 <i>cell line</i>), IC ₅₀ 81,7 μ M] (Chen <i>et al.</i> , 2006).
Cucurbitacin D	<i>H. angustifolia</i>	Sitotoksik [pada sel karsinoma hepatocellular (BEL-7402 <i>cell line</i>), IC ₅₀ 1,41 μ M dan melanoma malignan (SK-MEL-28 <i>cell line</i>), IC ₅₀ 1,22 μ M] (Chen <i>et al.</i> , 2006).
Cucurbitacin J	<i>H. angustifolia</i>	Sitotoksik [pada sel karsinoma hepatocellular (BEL-7402 <i>cell line</i>), IC ₅₀ 1,37 μ M dan melanoma malignan (SK-MEL-28 <i>cell line</i>), IC ₅₀ 1,28 μ M] (Chen <i>et al.</i> , 2006).
7,8-epoksi melochinon	<i>M. umbellata</i>	Sitotoksik [pada sel murin leukemia (P-388), IC ₅₀ 0,26 μ g/ml] (Erwin, 2010).
Olean-12-en-2,3,23-triol-28-oat	<i>Pterospermum subpeltatum</i> C.B.Rob	Sitotoksik [pada sel murin leukemia (P-388), IC ₅₀ 58 μ g/ml] (Salempa, 2010).
Olean-12-en-2,3-diol-28-oat	<i>P. subpeltatum</i> C.B.Rob	Sitotoksik [pada sel murin leukemia (P-388), IC ₅₀ 15 μ g/ml] (Salempa, 2010).

E. Kerangka Pikir Penelitian

K. hospita (paliasa) adalah salah satu spesies tumbuhan Sterculiaceae yang banyak tumbuh di daerah Sulawesi Selatan. Berdasarkan survei etnobotani daun *K. hospita* dimanfaatkan sebagai obat penyakit hati, hepatitis, kolesterol tinggi, diabetes, hipertensi, dan pneumonia. Studi bioaktivitas menunjukkan bahwa ekstrak daun *K. hospita* meningkatkan regenerasi sel-sel hati mencit, aktivitas antioksidan tinggi dan sitotoksitas moderat terhadap sel kanker hati HepG2. Ekstrak kayu batang *K. hospita* menghasilkan senyawa normonoterpenoid yang sangat aktif baik terhadap *A. salina* maupun sel tumor leukemia P-388. Ekstrak kulit akar *K. hospita* mengandung senyawa golongan terpenoid, fenolik, dan steroid yang berpotensi menghambat kanker prostat dan sebagai obat terapi penyakit alergi. Berdasarkan hasil penelusuran tersebut kayu akar *K. hospita* diyakini menghasilkan senyawa-senyawa metabolit sekunder dengan bioaktivitas menarik khususnya terhadap sel kanker rahim.

Penelitian pada kayu akar *K. hospita* dilakukan dengan metode isolasi dan pemurnian yang meliputi ekstraksi, fraksinasi, rekristalisasi, dan analisis spektroskopi untuk mendapatkan senyawa murni dan menentukan struktur molekulnya. Selanjutnya dilakukan uji bioaktivitas primer terhadap larva udang *A. salina*, dan uji sitotoksitas terhadap sel kanker rahim. Apabila hasil uji bioaktivitas menunjukkan aktivitas terhadap sel kanker rahim maka diperoleh senyawa antikanker.



Gambar 8. Skema Kerangka Pikir

BAB III

METODE PENELITIAN

Metode penelitian ini mengacu pada metode yang lazim digunakan dalam mengisolasi senyawa organik bahan alam, meliputi pemilihan spesies tumbuhan, penentuan lokasi pengambilan sampel, persiapan dan pengambilan sampel tumbuhan, dan pengolahan sampel yang meliputi ekstraksi, isolasi, pemurnian, uji kemurnian, elucidasi struktur (identifikasi), dan uji bioaktivitas (Harborne, 1987).

A. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat gelas yang umum digunakan di laboratorium, *rotary evaporator*, timbangan digital, alat fraksinasi (KKV dan KKT), alat KLT (*chamber* KLT, pipa kapiler, pensil, *cutter*, mistar, dan lampu UV), kompor listrik, alat uji BST (wadah penetasan, mikropipet, *microplate*, tabung Ependorf), penyaring kristal, alat pengukur titik leleh (*Electrothermal Melting Point Apparatus*), spektrometer FTIR Shimadzu tipe IRPrestige-21 dengan plat KBr, dan spektrometer NMR JEOL tipe JNM-ECA 500 yang bekerja pada 500 MHz.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kayu akar tumbuhan *K. hospita*, pelarut-pelarut berkualitas teknis seperti

metanol, n-heksan, etil asetat, aseton dan beberapa pelarut berkualitas p.a seperti kloroform, silika gel *Merck* 60 GF₂₅₄ katalog 7730 untuk KKV, silika gel *Merck* katalog 7734 untuk KKT, silika gel *Merck* katalog 7733 untuk impregnasi sampel, plat aluminium silika gel *Merck Kieselgel* 60 F₂₅₄ 0,25 nm katalog 1.05553 untuk analisis KLT, CeSO₄ 2 % dalam H₂SO₄ 2 N, garam laut (*sea salt*) *Sigma* katalog S-9883, DMSO *Merck* katalog 802912, benur *A. salina*, aquades dan aquabides.

B. Objek Penelitian

Objek dalam penelitian ini adalah tumbuhan *K. hospita* dan sampel yang diteliti adalah bagian kayu akarnya.

C. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 7 bulan yaitu mulai dari Bulan Desember 2010 sampai Bulan Juli 2011. Penelitian dilakukan pada beberapa tempat yaitu :

1. Laboratorium Kimia Organik FMIPA Unhas untuk proses ekstraksi, isolasi, pengukuran titik leleh, dan uji bioaktivitas dengan *A. salina*.
2. Laboratorium Kimia Organik ITB untuk penghitungan LC₅₀.
3. Laboratorium Kimia Organik Universitas Negeri Yogyakarta untuk uji bioaktivitas terhadap sel kanker rahim (HeLa).
4. Laboratorium Kimia Organik UGM dan Laboratorium Terpadu Jurusan Kimia FMIPA UNHAS untuk pengukuran spektroskopi IR.
5. Puslit Kimia LIPI Serpong untuk pengukuran spektroskopi NMR.

D. Prosedur Penelitian

1. Pengumpulan Sampel

Kayu akar *K. hospita* dikumpulkan oleh peneliti sebelumnya dari Desa Jambu Kecamatan Bajo Kabupaten Luwu Sulawesi Selatan pada bulan Februari 2006 dan telah dikonfirmasi di Herbarium Bogoriense LIPI Bogor (Lampiran 1). Sampel kayu akar dibersihkan, dikeringkan, dipotong-potong kecil dan dihaluskan sehingga diperoleh serbuk kayu akar seberat 5 kg.

2. Ekstraksi

Serbuk kayu akar *K. hospita* sebanyak 5 kg diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan metanol (MeOH) sebanyak 22 liter selama 5 x 24 jam sesuai hasil analisis KLT. Hasil maserasi kemudian disaring dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* menghasilkan maserat metanol sebanyak 3,4 liter. Maserat tersebut kemudian dipartisi menggunakan pelarut mulai dari pelarut non polar *n*-heksan, semipolar CHCl₃, dan polar EtOAc. Hasil partisi EtOAc kemudian diproses lebih lanjut dengan cara fraksinasi.

3. Isolasi

Pada tahap ini ekstrak EtOAc difraksinasi menggunakan KKV dan KKT menggunakan eluen yang sesuai berdasarkan hasil analisis dengan KLT hingga mendapatkan isolat tunggal. Isolat tunggal yang diperoleh diuji

kemurniannya melalui analisis KLT menggunakan tiga macam sistem eluen dan mengukur titik leleh isolat yang berbentuk kristal.

4. Identifikasi

Penetapan struktur senyawa dilakukan melalui uji golongan dan pengukuran spektrum beberapa alat instrumentasi yang saling mendukung antara lain Spektroskopi Inframerah (IR) dan Spektroskopi NMR 1 dan 2 dimensi.

5. Uji Bioaktivitas

Ekstrak MeOH, ekstrak EtOAc, dan senyawa murni diuji toksisitasnya terhadap udang *A. salina* dengan metode Meyer *et al.* (1982) (Lampiran 8). Larva *A. salina* diperoleh dengan menetasakan telur udang *A. salina* dalam medium air–sea salt (NaCl) selama 48 jam. Jumlah larva yang mati dan dapat bertahan hidup dalam ekstrak, fraksi, dan isolat tunggal dengan variasi konsentrasi dicatat dan nilai LC_{50} dihitung menggunakan program *Bliss Method*. Uji bioaktivitas terhadap sel kanker rahim HeLa dilakukan dengan metode MTT (Lampiran 13).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

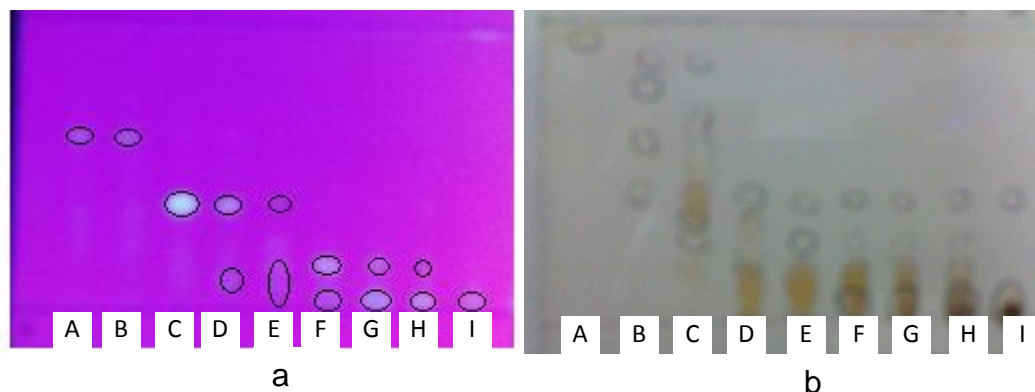
A. Hasil

1. Ekstraksi

Maserat metanol yang dihasilkan dari maserasi adalah 76,84 g. Ekstrak tersebut kemudian dipartisi dengan *n*-heksan, CHCl₃, dan EtOAc sehingga dihasilkan ekstrak *n*-heksan berupa endapan berwarna coklat kehijauan seberat 7,59 gram, ekstrak CHCl₃ berupa endapan berwarna coklat kemerahan seberat 12,40 g dan ekstrak EtOAc berupa endapan berwarna coklat seberat 11,55 gram (Lampiran 2).

2. Isolasi

Ekstrak EtOAc seberat 11,55 g difraksinasi menggunakan KKV diameter 7 cm yang dikemas dengan silika gel nomor katalog 7730 setinggi 5,5 cm dengan eluen *n*-heksan, aseton:CHCl₃:*n*-heksan, aseton:kloroform, aseton, dan MeOH dengan peningkatan kepolaran (Lampiran 2). Pada tahap ini diperoleh 17 fraksi dengan kromatogram pada (Lampiran 3). Fraksi – fraksi yang mempunyai nilai R_f sama digabungkan sehingga diperoleh 9 fraksi utama (A-I) dengan kromatogram seperti yang terlihat pada Gambar 9.

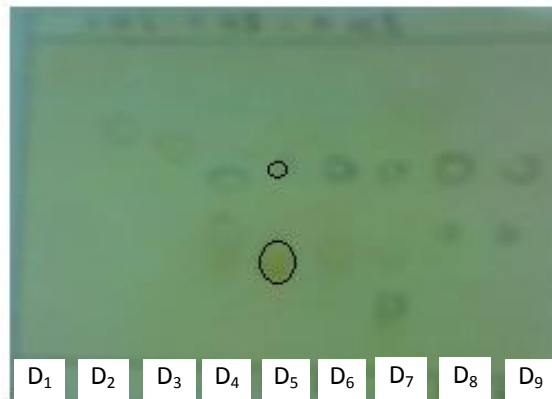


Gambar 9 . Kromatogram hasil analisis KLT fraksi utama A-I :
 a. pada *long wave* λ 365 nm
 b. setelah disemprot dengan CeSO_4 dan dibakar

Fraksi D dan E berupa endapan berwarna kuning, berpendar biru di bawah lampu UV *long wave* dan menunjukkan noda dominan berwarna kuning setelah disemprot CeSO_4 (Gambar 9b); sedangkan fraksi I berupa endapan coklat dengan noda dominan dan sederhana sehingga ketiga fraksi tersebut dipilih untuk difraksinasi lebih lanjut.

Fraksi D dan E.

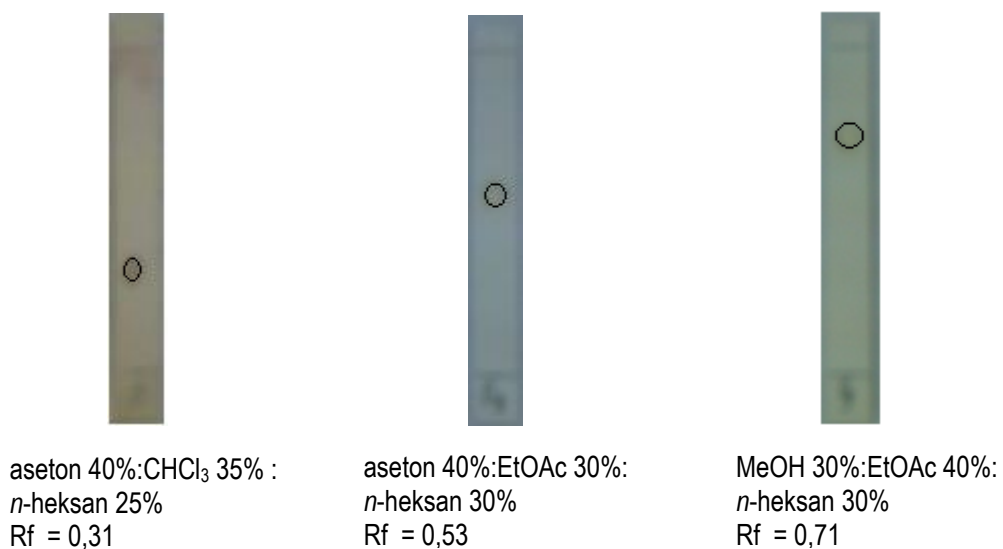
Gabungan fraksi D dan E seberat 100,50 mg difraksinasi menggunakan KKT diameter 1 cm yang dikemas dengan silika gel nomor katalog 7734 setinggi 15 cm dengan eluen *n*-heksan, aseton 25% : CHCl_3 50% : *n*-heksan 25%, aseton 40% : CHCl_3 25% : *n*-heksan 35%, dan aseton 45% : CHCl_3 45% : *n*-heksan 10%, aseton 100%, dan metanol 100%. Pada tahap ini diperoleh 30 fraksi (Lampiran 4). Berdasarkan kromatogram hasil analisis dengan KLT diperoleh 9 fraksi utama yaitu fraksi D_1 sampai D_9 (Gambar 10).



Gambar 10. Kromatogram hasil analisis KLT fraksi utama D₁ – D₉

Kromatogram menunjukkan bahwa fraksi D₅ terdapat noda berwarna kuning dominan setelah disemprot dengan CeSO₄ dan dipanaskan. Pada fraksi D₅ ini terbentuk kristal berupa serbuk berwarna kuning pucat seberat 15,6 mg. Selanjutnya dilakukan analisis dengan KLT terhadap kristal ini dan diperoleh noda tunggal.

Uji kemurnian dilakukan melalui analisis dengan KLT menggunakan tiga macam sistem eluen (Gambar 11) dengan nilai R_f berturut-turut 0,31 (aseton 40% : CHCl₃ 35% : *n*-heksan 25%), 0,53 (aseton 40% : EtOAc 30% : *n*-heksan 30%), dan 0,71 (MeOH 30%:EtOAc 40%: *n*-heksan 30%).



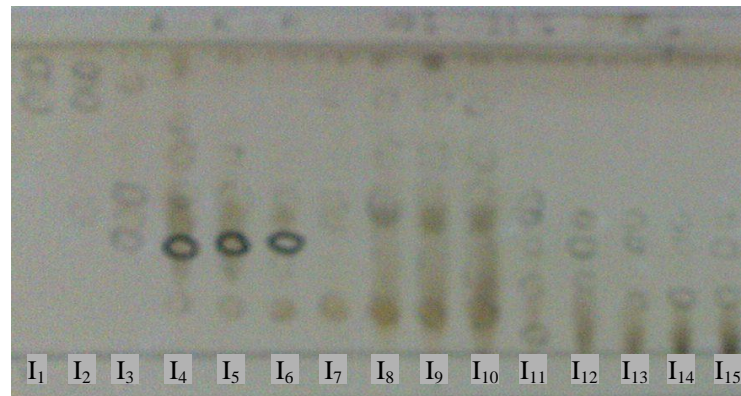
Gambar 11. Kromatogram hasil analisis KLT isolat [I]

Kromatogram di atas menunjukkan noda tunggal pada 3 komposisi eluen dan Rf yang berbeda-beda. Berdasarkan kromatogram hasil analisis KLT tersebut dinyatakan bahwa kristal dari fraksi D₅ merupakan isolat tunggal yang berpendar hitam pada lampu UV λ 254 nm, berpendar biru pada lampu UV λ 365 nm, dan menampakkan noda berwarna kuning setelah disemprot CeSO₄ dan dipanaskan. Isolat ini dinyatakan sebagai senyawa [I] seberat 12 mg dengan titik leleh 156-157 °C. Uji golongan menghasilkan endapan putih pada penambahan pereaksi Meyer yang menunjukkan bahwa senyawa [I] merupakan senyawa alkaloid. Bagan fraksinasi fraksi D dan E dapat dilihat pada Lampiran 5.

Fraksi I

Fraksi I seberat 5,1 gram difraksinasi menggunakan KKV diameter 7 cm yang dikemas dengan silika gel nomor katalog 7730 setinggi 5,5 cm dengan eluen *n*-heksan, EtOAc:*n*-heksan, aseton:EtOAc:*n*-heksan,

aseton, dan metanol dengan urutan kepolaran yang ditingkatkan. Pada tahap ini diperoleh 34 fraksi dan fraksi-fraksi yang mempunyai nilai R_f sama digabungkan (Lampiran 6) sehingga diperoleh 15 fraksi utama ($I_1 - I_{15}$) (Gambar 12).



Gambar 12. Kromatogram hasil analisis KLT fraksi utama $I_1 - I_{15}$

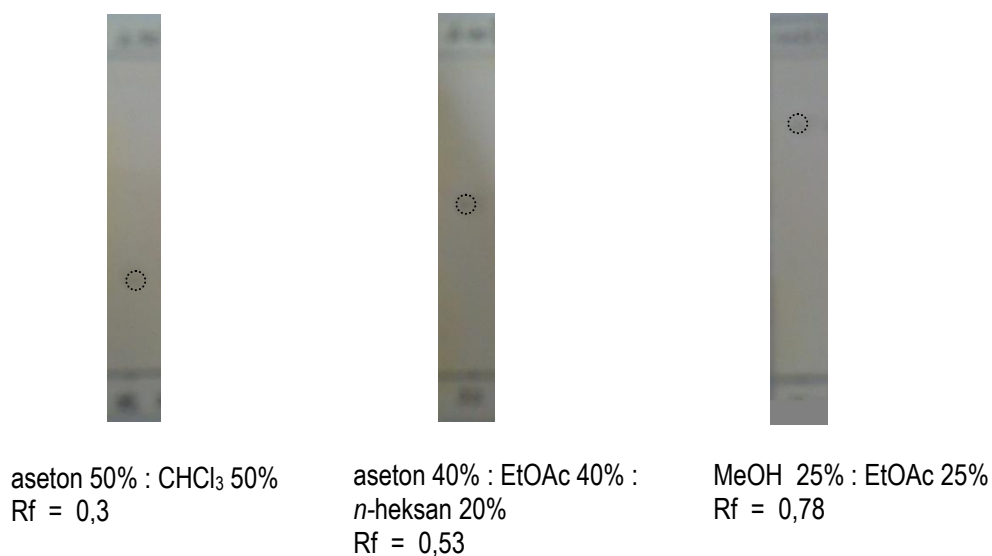
Pada fraksi $I_{13} - I_{15}$ terbentuk endapan putih yang setelah dianalisis melalui KLT menunjukkan noda dengan R_f yang sama (Gambar 13) sehingga endapan $I_{13} - I_{15}$ dapat digabung.



Gambar 13. Kromatogram hasil analisis KLT endapan I_{13}, I_{14}, I_{15}

Endapan gabungan $I_{13}, I_{14},$ dan I_{15} seberat 8,5 mg direkristalisasi dengan etanol panas menghasilkan kristal putih seberat 3,5 mg. Uji kemurnian dilakukan melalui analisis dengan KLT menggunakan tiga

macam sistem eluen (Gambar 14) dengan nilai Rf berturut-turut 0,30 (aseton 50% : CHCl_3 50%), 0,53 (aseton 40% : EtOAc 40% : *n*-heksan 20%), dan 0,78 (MeOH 25%: EtOAc 75%).



Gambar 14. Kromatogram hasil analisis KLT isolat [II]

Kromatogram di atas menunjukkan noda tunggal pada 3 sistem eluen dan Rf yang berbeda-beda. Berdasarkan kromatogram hasil analisis KLT tersebut dinyatakan bahwa kristal tersebut merupakan isolat tunggal yang menampakkan noda setelah disemprot CeSO_4 dan dibakar. Isolat ini dinyatakan sebagai senyawa [III] yang terdekomposisi pada suhu 278-280°C. Hasil uji golongan Lieberman – Buchard (LB) memberikan warna biru setelah penambahan asam asetat anhidrat dan H_2SO_4 yang menunjukkan positif senyawa steroid. Bagan fraksinasi fraksi I dapat dilihat pada Lampiran 7.

3. Identifikasi

Senyawa [I]

Senyawa [I] diperoleh sebagai serbuk kuning pucat sebanyak 12 mg dengan titik leleh 156-157 °C. Data spektroskopi senyawa [I] yaitu IR (KBr) ν_{maks} cm^{-1} : 3363 (OH), 2924 (C-H alifatik), 1450 dan 1350 (tekukan untuk CH₂ dan CH₃), 1637, 1583, 1512 (C=N dan C=C aromatik), 1219 dan 1072 (C-O aromatik), 3078 (ulur C-H aromatik), 825 (aromatik tersubstitusi para); ¹H-NMR (500 MHz, aseton [d6]) δ ppm : 6,86 (1H, *d*, *J* = 7,9 Hz, H-3), 6,84 (1H, *d*, *J* = 7,9 Hz, H-4), 7,18 (1H, *d*, *J* = 1,3 Hz, H-5), 7,06 (1H, *dd*, *J* = 8,4 & 1,3 Hz, H-7), 7,44 (1H, *d*, *J* = 8,4 Hz, H-8), 6,57 (1H, *dd*, *J* = 15,6 & 2,6 Hz, H-9), 7,47 (1H, *dd*, *J* = 15,6 & 7,1 Hz, H-10), 3,37/3,59 (2H, *m*, H-11), 4,74 (1H, *dd*, *J* = 3,2 & 7,8 Hz, H-12), 7,23 (2H, *dd*, *J* = 8,4 & 1,9 Hz, H-2' & H-6'), 6,80 (2H, *dd*, *J* = 8,4 & 1,9 Hz, H-3' & H-5'), 3,89 (3H, *s*, 3C-OCH₃); ¹³C-NMR (500 MHz, aseton [d6]) δ ppm : 166,6 (C-2), 115,8 (C-3), 115,3 (C-4), 127,4 (C-4a), 110,4 (C-5), 147,8 (C-6), 121,9 (C-7), 129,4 (C-8), 148,6 (C-8a), 118,9 (C-9), 140,0 (C-10), 47,9 (C-11), 72,8 (C-12), 134,4 (C-1'), 127,2 (C-2' & C-6'), 114,9 (C-3' & C-5'), 156,6 (C-4'), 55,4 (3C-OCH₃).

Senyawa [II]

Senyawa [II] diperoleh sebagai serbuk putih sebanyak 3,5 mg dengan suhu dekomposisi 278-280 °C. Data spektroskopi senyawa [II] yaitu IR (KBr) ν_{maks} cm^{-1} : 3419 (OH), 2958, 2931, 2868 (C-H alifatik),

1462, 1381, dan 1367 (tekukan untuk CH₂ dan CH₃), 1633 (C=C olefin), 1255, 1024 (C-O).

4. Bioaktivitas

Nilai toksisitas (LC₅₀) ekstrak awal (maserat MeOH) terhadap *A. salina* adalah 0,21 µg/ml. Selanjutnya LC₅₀ ekstrak hasil partisi yaitu ekstrak *n*-heksan, ekstrak CHCl₃, dan ekstrak EtOAc secara berurutan adalah 1513,56, 10.908,46, dan 92,36 µg/ml. Kedua isolat yaitu senyawa [I] dan [II] memiliki nilai LC₅₀ 1511,77 dan 547,45 µg/ml. Sedangkan nilai sitotoksitas (IC₅₀) senyawa [I] dan [II] terhadap sel HeLa adalah 429,54 dan 626,61 µg/ml (Lampiran 14 dan 15).

B. Pembahasan

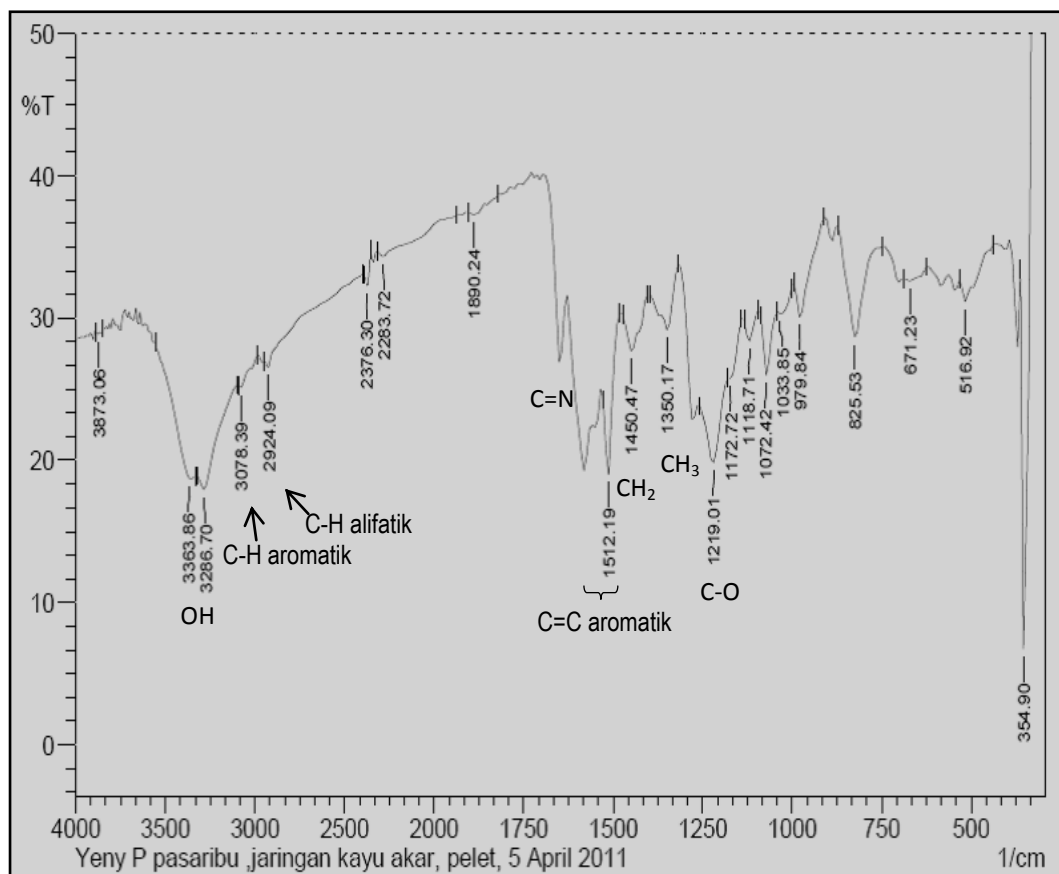
1. Senyawa [I]

Senyawa [I] diperoleh sebagai serbuk kuning pucat sebanyak 12 mg dengan titik leleh 156-157 °C. Hasil analisis golongan menampilkan endapan putih pada penambahan pereaksi Meyer yang menunjukkan bahwa senyawa [I] positif senyawa alkaloid. Data tersebut didukung oleh data spektrum IR (KBr) yang memperlihatkan puncak serapan (ν_{maks}) pada 3078 cm⁻¹ yang mengindikasikan adanya gugus aromatik yang didukung adanya vibrasi regangan pada 1637, 1583, 1512 cm⁻¹ untuk ikatan C=N dan C=C aromatik, vibrasi regangan pada 1219 cm⁻¹ untuk ikatan C-O aromatik, dan serapan pada 825 cm⁻¹ mengindikasikan aromatik tersubstitusi para. Serapan pada 2924 cm⁻¹ mengindikasikan adanya

gugus C-H alifatik yang didukung adanya serapan pada 1450 dan 1350 cm^{-1} yang khas untuk metilen (CH_2) dan metil (CH_3) (Gambar 15 dan Tabel 3). Serapan-serapan tersebut karakteristik untuk senyawa alkaloid.

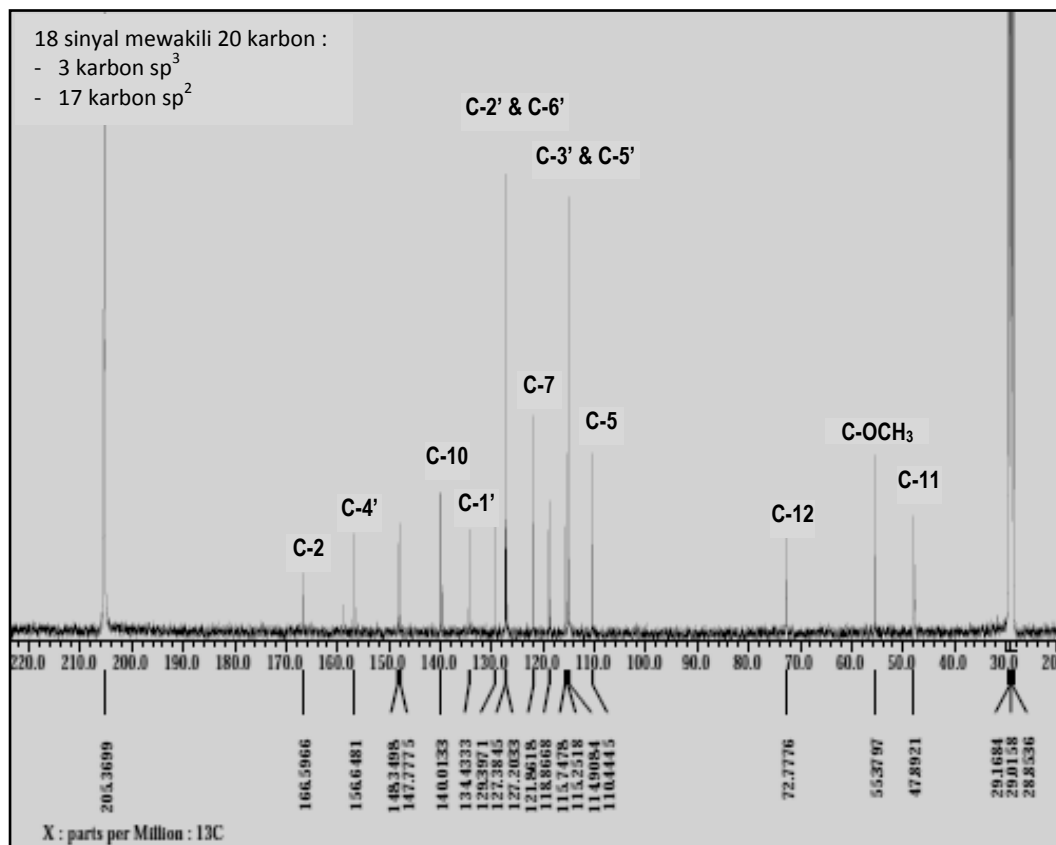
Tabel 3. Data Spektrum IR Senyawa [I]

Daerah serapan (cm^{-1})	Tafsiran gugus fungsi
3078	C-H aromatik
1637	C=N aromatik
1583, 1512	C=C aromatik
1219	C-O aromatik
2924, 1450 dan 1350	alifatik (CH_2 dan CH_3)



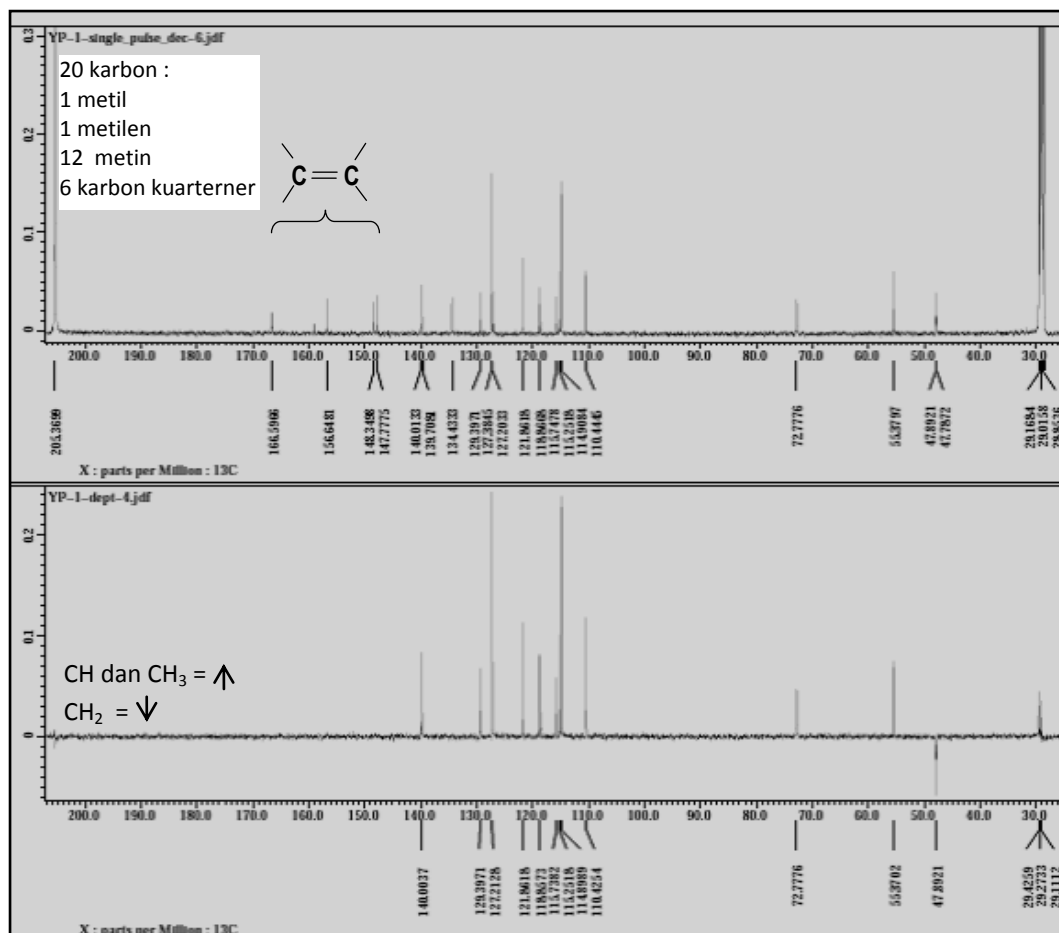
Gambar 15. Spektrum IR senyawa [I]

Penentuan struktur lebih lanjut senyawa [I] dilakukan dengan analisis $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ serta spektrum NMR 2D. Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa [I] memperlihatkan 18 sinyal karbon yang mewakili 20 atom karbon (Gambar 16 dan Tabel 4).



Gambar 16. Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa [I]

Identifikasi masing-masing atom karbon tersebut ditentukan berdasarkan spektrum DEPT 135 (Gambar 17). Spektrum DEPT 135 menunjukkan 20 atom karbon yang terdistribusi menjadi 3 karbon sp^3 dan 17 karbon sp^2 . Tiga karbon sp^3 tersebut terdiri dari 1 karbon metil pada δ 55,4 ppm, 1 karbon metilen pada δ 47,9 ppm dan 1 metin oksikarbon pada δ 72,8 ppm.

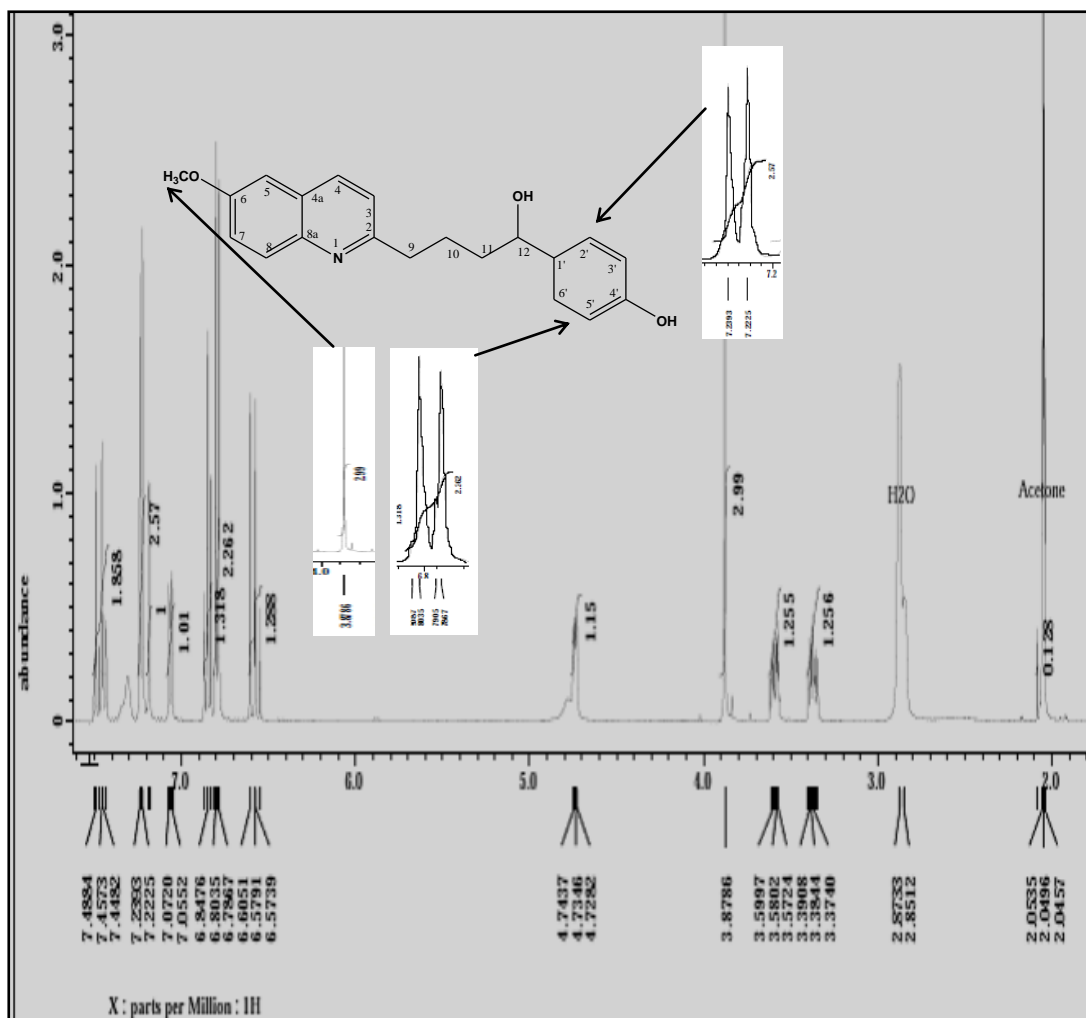


Gambar 17. Spektrum DEPT 135 Senyawa [1]

Selanjutnya 17 karbon sp^2 terdiri dari 2 karbon vinilik pada δ 140,0 dan 118,9 ppm, 1 oksiaril pada δ 147,8 ppm, 9 metin aromatik pada δ 110,4, 114,9, 115,2, 115,7, 121,9, 127,2, dan 129,4 ppm dan 5 karbon kuarterner aromatik pada δ 127,4, 134,4, 148,3, 156,6, dan 166,6 ppm. Unit – unit karbon tersebut mengindikasikan adanya kerangka alkaloid quinolin (Fournet *et al.*, 1989).

Tabel 4. Data Spektroskopi ^1H NMR dan ^{13}C NMR Senyawa [I]

Posisi	^1H -NMR δ ppm (H, <i>multiplisitas</i> , <i>konstanta kopling</i>)	^{13}C -NMR δ ppm	COSY H \leftrightarrow H	HMBC H \rightarrow C
1	-	-	-	-
2	-	166,6	-	-
3	6,86 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7,9)	115,8	-	C-4a
4	6,84 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7,9)	115,3	-	C-4a
4a	-	127,4	-	-
5	7,18 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,3)	110,4	-	C-7, C-8a
6	-	147,8	-	-
7	7,06 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,4 & 1,9)	121,9	-	C-5, C-8a
8	7,44 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,4)	129,4	-	-
8a	-	148,6	-	-
9	6,57 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 15,6 & 2,6)	118,9	H-10	C-2
10	7,47 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 15,6 & 7,1)	140,0	H-9	C-2
11	3,37/3,59 (2H, <i>m</i>)	47,9	H-12	-
12	4,74 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 3,2 & 7,8)	72,8	H-11	-
1'	-	134,4	-	-
2'	7,23 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,4 & 1,9)	127,2	H-3'	C-12, C-4', C-6'
3'	6,80 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,4 & 1,9)	114,9	H-2'	C-1', C-4', C-5'
4'	-	156,6	-	-
5'	6,80 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,4 & 1,9)	114,9	H-6'	C-1', C-4', C-3'
6'	7,23 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,4 & 1,9)	127,2	H-5'	C-12, C-4', C-2'
OCH ₃	3,89 (3H, <i>s</i>)	55,4	-	C-6



Gambar 18. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ Senyawa [1]

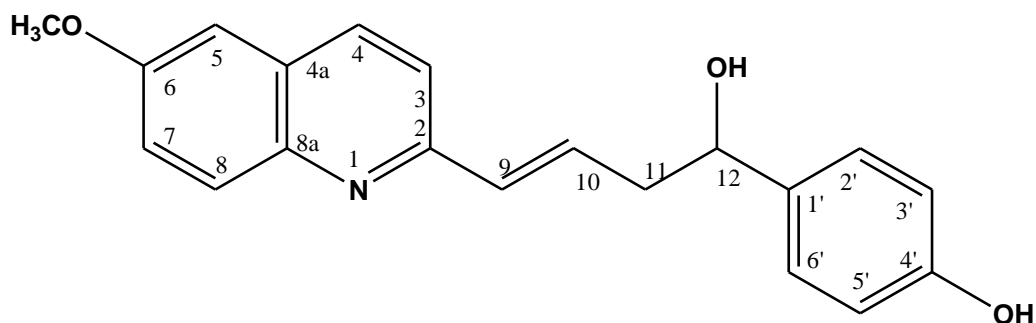
Spektrum $^1\text{H-NMR}$ (Gambar 18 dan Tabel 4) memperlihatkan sejumlah sinyal aromatik yang sesuai untuk satu cincin aromatik pada kerangka quinolin yaitu pada δ_{H} 7,06 ppm (1H, *dd*, $J = 8,4$ dan $1,9$ Hz, H-7), 7,18 ppm (1H, *d*, $J = 1,3$ Hz, H-5), dan 7,44 ppm (1H, *d*, $J = 8,4$ Hz, H-8). Sejumlah sinyal pada δ_{H} 6,57 ppm (1H, *dd*, $J = 15,6$ dan $2,6$ Hz, H-9), 7,47 ppm (1H, *dd*, $J = 15,6$ dan $7,1$ Hz, H-10), 3,37 dan 3,59 ppm (2H, *m*, H-11) menunjukkan bahwa terdapat unit alilik dengan posisi *trans*.

Sejumlah sinyal aromatik pada δ_H 7,23 ppm (2H, *dd*, $J = 8,4$ dan $1,9$ Hz, H-2' dan H-6') dan 6,80 ppm (2H, *dd*, $J = 8,4$ dan $1,9$ Hz, H-3' dan H-5') menunjukkan adanya cincin benzena disubstitusi. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ juga memperlihatkan sinyal pada δ_H 3,88 ppm (3H, *s*) yang sesuai untuk satu substituen gugus metoksi pada kerangka quinolin.

Hubungan antara sinyal proton (^1H) dan karbon (^{13}C) yang bersesuaian ditunjukkan pada spektrum NMR 2 dimensi yaitu HMQC (Lampiran 10).

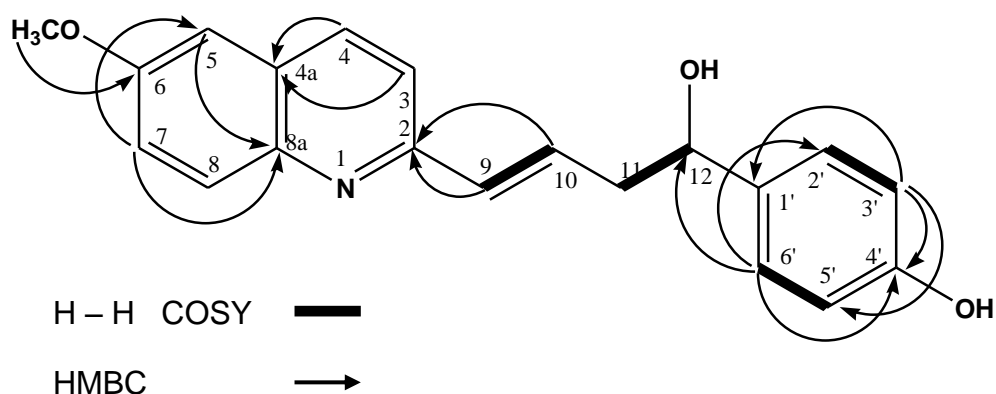
Spektrum 2D H-H COSY (Lampiran 11 dan Gambar 20) memperlihatkan adanya korelasi antara proton pada δ_H 6,57 ppm (H-9) dengan proton pada δ_H 7,47 ppm (H-10), antara proton pada δ_H 4,74 ppm (H-12) dengan proton pada δ_H 3,37/3,59 ppm (H-11), dan antara proton pada δ_H 7,23 ppm (H-2' dan H-6') dengan proton pada δ_H 6,80 ppm (H-3' dan H-5'). Korelasi ini menunjukkan bahwa proton-proton yang berkorelasi tersebut merupakan proton-proton dari karbon yang bertetangga.

Berdasarkan data-data IR, $^{13}\text{C-NMR}$, $^1\text{H-NMR}$, DEPT, HMQC, dan H-H COSY tersebut maka dapat diusulkan bahwa senyawa **[I]** merupakan senyawa alkaloid quinolin dengan substituen metoksi ($-\text{OCH}_3$), alilik, dan benzena tersubstitusi dengan struktur seperti pada Gambar 19.



Gambar 20. Usulan Struktur Senyawa [I]

Pembuktian struktur senyawa [I] diperlihatkan pada spektrum 2D HMBC yang menunjukkan adanya korelasi jarak jauh H - C (Lampiran 12 dan Gambar 20). Pada spektrum HMBC terlihat adanya korelasi jarak jauh antara proton pada δ_H 6,57(H-9) dan δ_H 7,47 (H-10) dengan karbon pada δ_C 166,6 ppm (C-2) menunjukkan bahwa unit trans alilik terikat pada kerangka quinolin. Adanya korelasi antara proton pada δ_H 6,57(H-9) dan δ_H 7,47 (H-10) dengan karbon pada δ_C 147,8 ppm (C-6) menegaskan bahwa substituen metoksi terikat pada kerangka quinolin. Adanya korelasi antara proton pada δ_H 6,57(H-9) dan δ_H 7,47 (H-10) dengan karbon pada δ_C 166,6 ppm (C-2) menunjukkan bahwa unit trans alilik terikat pada kerangka quinolin.



Gambar 20. Korelasi HMBC dan COSY Usulan Struktur Senyawa [I]

Namun beberapa proton tidak memperlihatkan korelasi HMBC sehingga belum dapat ditentukan struktur molekul yang tepat.

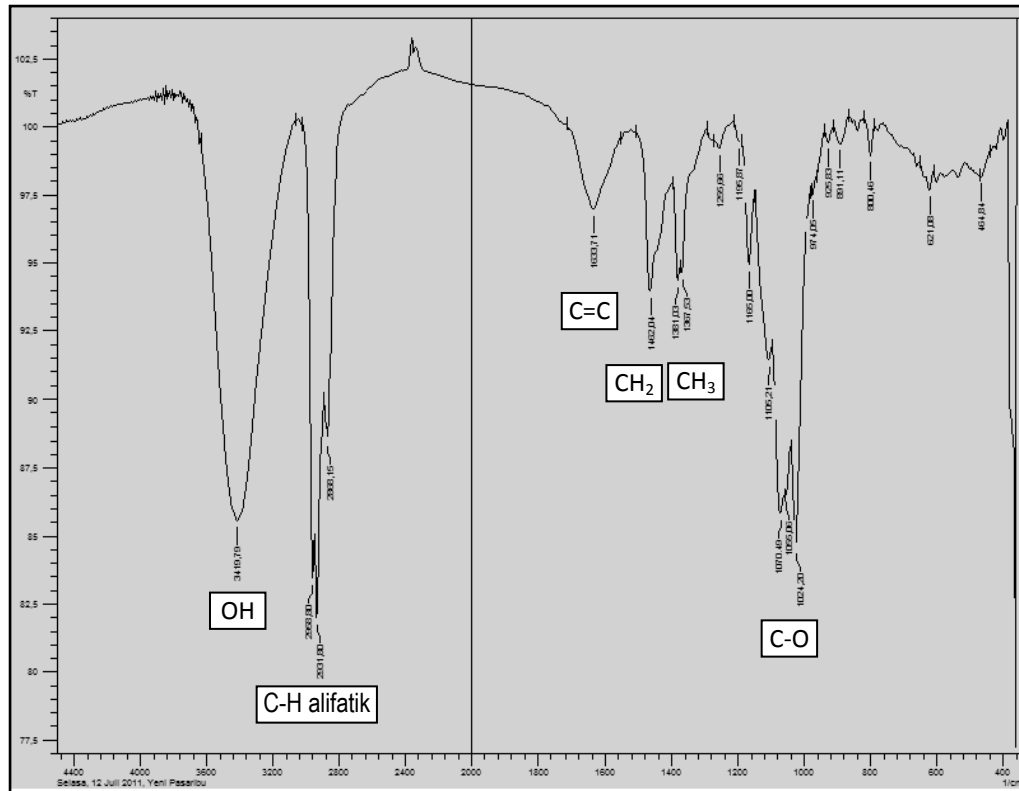
2. Senyawa [II]

Senyawa [II] diperoleh sebagai serbuk putih sebanyak 3,5 mg dan terdekomposisi pada suhu 278-280 °C. Hasil uji golongan Lieberman-Burchard (LB) memberikan warna biru setelah penambahan asam asetat anhidrat dan H₂SO₄ yang menunjukkan positif senyawa steroid.

Analisis spektroskopi IR (KBr) senyawa [II] (Gambar 21 dan Tabel 4) memperlihatkan serapan (ν_{maks}) pada 3419 cm⁻¹ yang mengindikasikan adanya gugus hidroksil (OH) dan didukung dengan serapan pada 1255 dan 1024 cm⁻¹ untuk vibrasi ulur C-O. Selain itu terdapat juga serapan pada 1633 cm⁻¹ yang mengindikasikan adanya gugus olefin (C=C). Adanya serapan pada daerah 2958, 2931, 2868 cm⁻¹ menunjukkan adanya C-H alifatik yang didukung adanya tekukan metilen pada 1462 cm⁻¹ dan tekukan metil pada 1381 dan 1367 cm⁻¹.

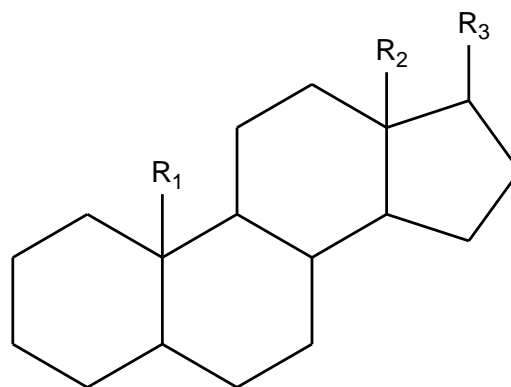
Tabel 5. Data Spektrum IR Senyawa [II]

Daerah serapan (cm ⁻¹)	Tafsiran gugus fungsi
3419	hidroksil (OH)
1255 dan 1024	C-O alifatik
1633	olefin (C=C)
2958, 2931, 2868, 1381 dan 1367	alifatik (CH ₂ dan CH ₃)



Gambar 21. Spektroskopi IR Senyawa **III**

Serapan-serapan pada spektrum IR tersebut karakteristik untuk senyawa steroid. Data spektroskopi yang ada tidak mencukupi untuk dapat menentukan struktur molekul senyawa **III** sehingga hanya bisa digambarkan kerangka strukturnya seperti pada Gambar 22.



Gambar 22. Kerangka Struktur Senyawa Steroid

3. Bioaktivitas

Hasil uji toksisitas ekstrak metanol kayu akar *K. hospita* terhadap *A. salina* adalah LC_{50} 0,21 $\mu\text{g/ml}$ sedangkan nilai LC_{50} dari ekstrak hasil partisi yaitu ekstrak *n*-heksan, CHCl_3 dan EtOAc berurutan adalah >1000, >10.000 dan 92,36 $\mu\text{g/ml}$ (Tabel 6). Nilai LC_{50} ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol dan EtOAc memiliki tingkat toksisitas tinggi berdasarkan ketentuan nilai LC_{50} (Tinjauan Pustaka halaman 27). Data tersebut mengindikasikan bahwa di dalam kayu akar *K. hospita* terkandung metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antikanker. Indikasi ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Chen *et al.* (2006) yang melaporkan bahwa dari ekstrak MeOH akar *H. angustifolia* telah ditemukan senyawa Cucurbitacin D (**33**) dan Cucurbitacin J (**34**) yang mempunyai bioaktivitas sitotoksik terhadap sel karsinoma hepatocellular (BEL-7402 *cell line*) dan melanoma malignan (SK-MEL-28 *cell line*). Penelitian lainnya oleh Arung *et al.* (2009) menyimpulkan bahwa ekstrak MeOH *K. hospita* menunjukkan aktivitas antioksidan tinggi (90%) jika dibandingkan dengan vitamin C (98%) serta sitotoksitas moderat terhadap sel kanker hati HepG2. Selain itu penelitian yang dilakukan oleh Marzuki (2010) melaporkan adanya korelasi positif antara uji toksisitas terhadap *A. salina* (LC_{50} 146,1 $\mu\text{g/ml}$) dengan uji sitotoksitas terhadap sel Hela (IC_{50} 10,25 $\mu\text{g/ml}$) pada ekstrak EtOAc tumbuhan *Pterospermum celebicum* Miq.

Tabel 6. Hasil Uji Bioaktivitas Terhadap *A. salina* dan Sel Kanker Rahim (*HeLa cell line*)

Ekstrak/ Senyawa	Uji Bioaktivitas	
	LC ₅₀ (µg/ml) Uji BST	IC ₅₀ (µg/ml) Uji Sel HeLa
Ekstrak MeOH	0,21	-
Ekstrak <i>n</i> -heksan	1513,56	-
Ekstrak CHCl ₃	10.908,46	-
Ekstrak EtOAc	92,36	-
Senyawa [I]	1511,77	429,54
Senyawa [II]	547,45	626,61

Nilai LC₅₀ senyawa [I] dan [II] > 500 menunjukkan bahwa kedua senyawa tersebut tidak aktif terhadap *A. salina*. Nilai LC₅₀ ekstrak EtOAc yang lebih rendah daripada senyawa murni [I] dan [II] menunjukkan bahwa ekstrak EtOAc lebih aktif daripada kedua senyawa murni. Ekstrak EtOAc terdiri atas berbagai komponen termasuk di dalamnya senyawa [I] dan [II]. Hal ini mengindikasikan bahwa komponen yang aktif di dalam ekstrak tersebut kemungkinan bukanlah senyawa [I] dan [II] melainkan senyawa lainnya atau senyawa-senyawa tersebut bersinergi positif artinya bila beberapa komponen senyawa berada dalam ekstrak, akan dapat bersinergi sehingga bersifat aktif sedangkan bila berada dalam keadaan murni aktivitasnya menjadi lemah.

Menurut Meyer *et al.* (1982) jika nilai IC₅₀ < 30 µg/ml maka senyawa tersebut bersifat sitotoksik atau berpotensi sebagai antikanker. Nilai IC₅₀ senyawa [I] dan [II] > 30 µg/ml menunjukkan bahwa kedua senyawa

tersebut memiliki sitotoksisitas rendah terhadap sel kanker HeLa. Beberapa hasil penelitian terhadap spesies Sterculiaceae memperlihatkan sifat sitotoksik dari senyawa yang diisolasi seperti cucurbitacin D **(33)**, cucurbitacin J **(34)** (Chen *et al.*, 2006) dan 7,8-epoksi-melochinon **(9)** (Erwin, 2010). Meskipun senyawa-senyawa tersebut berasal dari jenis metabolit sekunder yang berbeda namun memiliki gugus aktif yang sama yaitu gugus fungsi karbonil yang terikat pada karbon α,β -tak jenuh. Berdasarkan hal tersebut maka dapat diprediksi bahwa senyawa [I] dan [II] memiliki sitotoksisitas rendah terhadap sel HeLa karena tidak memiliki gugus aktif tersebut.

Hasil uji toksisitas senyawa [I] dan [II] terhadap *A. salina* mempunyai kecenderungan yang mirip dengan hasil uji sitotoksisitas kedua senyawa tersebut sel kanker rahim HeLa. Hasil bioassay ini membuktikan bahwa terdapat korelasi positif antara uji BST dengan uji sel kanker HeLa seperti yang dilaporkan oleh Meyer (1982).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Dua metabolit sekunder telah diperoleh dari ekstrak EtOAc kayu akar tumbuhan *K. hospita* yaitu senyawa [I] alkaloid quinolin dengan titik leleh 156-157 °C dan senyawa [II] golongan steroid dengan suhu dekomposisi 278-280 °C.
2. Hasil uji toksisitas memperlihatkan bahwa kedua senyawa bersifat non toksik terhadap *A. salina* dengan LC₅₀ masing-masing senyawa adalah 1511,77 dan 547,45 µg/ml; sedangkan hasil uji sitotoksitas terhadap sel kanker rahim memperlihatkan bahwa kedua senyawa memiliki bioaktivitas rendah terhadap sel HeLa dengan IC₅₀ masing-masing senyawa adalah 429,54 dan 626,61 µg/ml.

B. Saran

1. Agar bisa memperoleh senyawa yang cukup untuk melengkapi semua data yang diperlukan maka dengan metode yang sama diperlukan jumlah sampel yang lebih banyak.
2. Bioaktivitas senyawa murni yang ditemukan jauh lebih rendah daripada ekstrak asalnya sehingga perlu dilakukan penelusuran lebih lanjut terhadap ekstrak EtOAc dari kayu akar *K. hospita* untuk mendapatkan senyawa-senyawa lain yang kemungkinan lebih toksik.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, S.A. 2004. Empat Puluh Tahun dalam Kimia Organik Bahan Alam Tumbuh-tumbuhan Tropika Indonesia : Rekoleksi dan Prospek. *Bulletin of the Indonesian Society of Natural Product Chemistry*. 4 (2) : 5-54.
- Achmad, S.A. 2007. *Keanekaragaman Hayati dalam Pembelajaran Ilmu Kimia*. Makalah disajikan dalam Seminar Nasional Kimia, Jurusan Kimia Universitas Negeri Makassar, Makassar, 5 September.
- Achmad S.A., Hakim, E.H., Makmur, L., Mujahidin D., Syah Y.M. 2000. *Sejumlah senyawa kimia baru dengan kerangka berlandaskan 3-isoprenil-flavon dari tumbuh-tumbuhan Moraceae hutan tropika Indonesia dan kegunaannya*. Makalah disajikan dalam Seminar Kimia Indonesia Wilayah Barat, Universitas Riau, Pekanbaru.
- Alam, M.S., Chopra, N., Ali, M., Niwa, M. 1995. Oleanen and Stigmasterol Derivatives from *Ambroma augusta*. *Phytochemistry*. 41(4): 1197-1200.
- Anderson, J.E., Goetz, C.M., and McLaughlin, J.L. 1990. A Blind Comparison of Simple Bench-top Bioassay and Human Tumor Cell Cytotoxicities as Antitumor Prescreen. *Phytochemical Analysis*. 6:107-111.
- Anonim. 2004. *Brine Shrimp Microwell Cytotoxicity Assay*. Departemen Kimia FMIPA ITB Bandung.
- Arung, E.T., Kusuma, I.W., Purwatiningsih, S., Roh, S.S., Yang, C.H., Jeon, S., Kim, Y.U., Sukaton, E., Susilo, J., Astuti, Y., Wicaksono, B.D., Sandra, F., Shimizu, K., Kondo, Ryuichiro. 2009. Antioxidant Activity and Cytotoxicity of the Traditional Indonesian Medicine Tangohai (*Kleinhovia hospita* L.) Extract. *J Acupunct Meridian Stud*. 2(4): 306-308.
- Aryanti, Ermayanti, T.M., Mariska, I., Bintang, M. 2005. Isolasi senyawa antikanker dari akar berambut *Artemia cina* dan aktivitas inhibisinya terhadap sel kanker mulut rahim. *Majalah Farmasi Indonesia*. 16(4): 192-196.
- Atun, S. 2005. *Pengembangan Potensi Bahan Alam Sebagai Sumber Penemuan Obat Baru*. Makalah disajikan dalam Seminar Nasional Kimia, Universitas Negeri Yogyakarta, 24 September.

- Bean, M. F., Antoun, M., Abramson, D., Chang, C.J., Laughlin, J.L., Cassady, J.M. 1985. Cucurbitacin B and isocucurbitacin B Cytotoxic Components of *Helicteres isora*. *Journal of Natural Product*. 48: 500-503.
- Chang, Y.S., Ku, Y.R., Lin, J.H., Lu, K.L., Ho, L.K. 2001. Analysis of three lupane type triterpenoids in *Helicteres angustifolia* by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 26 : 849-855.
- Chen, C., Chen, Z., and Hong, Y. 1990. A mansonone from *Helicteres Angustifolia*. *Phytochemistry*. 29(3): 980-982.
- Chen, W., Tang, W., Lou, L., and Zhao, W. 2006. Pregnane, coumarin and lupane derivatives and cytotoxic constituents from *Helicteres angustifolia*. *Phytochemistry*. 67: 1041-1047.
- Dias, G.C.D., Gressler, V., Hoenzel, S.C.C.M., Silva, U.F., Dalcol, I. I., Morel, A.F. 2007. Constituents of the roots of *Melochia chamaedrys*. *Phytochemistry*. 68: 668-672.
- Dini, I. 2005. *Penelusuran Metabolit Sekunder Ekstrak Kulit Batang Tumbuhan Paliasa (Kleinhovia hospita Linn.) dan Bioaktivitasnya terhadap Artemia salina Leach*. Tesis tidak diterbitkan. Makassar: Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin.
- Doyle, A and Griffiths, J.B. 2000. *Cell and Tissue Culture for Medical Research*. John Willey and Sons Ltd: New York.
- Ersam. 2004. *Keunggulan Biodiversitas Hutan Tropika Indonesia dalam Merekayasa Model Molekul Alami*. Makalah disajikan dalam Seminar Nasional Kimia VI. Jurusan Kimia FMIPA ITS, Surabaya.
- Erwin. 2010. *Penentuan Struktur Molekul Isolat Kayu Batang Melochia umbellata (Houtt.) Stapf var.degrabrata K (Paliasa) dan Uji Sel Murin Leukemia P-388*. Disertasi tidak diterbitkan. Makassar: Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin.
- Fournet, A., Vagneur, B., dan Bruneton, J.P.R. et. 1989. Aryl- 2 et alkyl-2 quinoleines nouvelles isolees d'une Rutacee bolivienne : *Galipea longiflora*. *Can. J. Chem*. 67: 2116-2118.
- Gaffar, I. 2009. *Kajian Metabolit Sekunder Kayu Batang Paliasa (Kleinhovia hospita Linn.) Sebagai Antitumor Leukemia P-388*. Disertasi tidak diterbitkan. Makassar: Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin.

- Gaffar, I., Noor, A., Soekamto, N. H. dan Harlim, T. 2009. Skrining Bioaktivitas Jaringan Tumbuhan Paliasa (*Kleinhovia hospita* L.) Asal Sulawesi Selatan. *Bulletin Pasca Sarjana - Plant Chemistry* 1: 25.
- Gaffar, I., Noor, A., Soekamto, N. H., dan Harlim, T. 2009. Senyawa Normonoterpenoid dari Ekstrak Kayu Batang Tumbuhan Paliasa (*Kleinhovia hospita* L.). *J.Sains & Teknologi*. 9(1) : 82-86.
- Ghosal, S., Kumar, Y., Singh, S.K., Kumar, A. 1986. A chemical constituents of Amaryllidaceae. Part 21. Ungeremine and criasbetaine, two antitumor alkaloids from *Crinum asiaticum*. *J.Chem.Res., Synop.* 112-113.
- Gressler, V., Stuker, C.Z., Dias, G.O.C., Dalcol, I.I., Burrow, R.A., Schmidt, J., Wessjohann, L., and Morel, A.F. 2008. Quinolone alkaloids from *Waltheria douradinha*. *Phytochemistry*. 69: 994-999.
- Hamza, O.J.M., van den Bout-van den Beukel, C.J.P., Matee, M.I.N., Moshi, M.J., Mikx, F.H.M., Selemani, H.O., Mbwambo, Z.H., Van der Ven, A.J.A.M., and Verweij, P.E. 2006. Antifungal activity of some Tanzanian plants used traditionally for the treatment of fungal infections. *Journal of Ethnopharmacology*. 108: 124-132.
- Hanum, I.F. and van der Maesen, L.J.G. 2007. *Plant Resource of Southeast Asia No.11. Auxiliary Plants*. Jakarta: LIPI Press.
- Harbone, J.B. 1987. *Metode Fitokimia*. Terjemahan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. 1987. Bandung: ITB.
- Hasni. 2002. *Pengaruh Infus Daun Paliasa (Kleinhovia hospita Linn.) Terhadap Transport Aktif Glukosa pada Usus Halus Marmut*. Skripsi tidak diterbitkan. Makassar: Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.
- Hasriani, A. 2008. *Isolasi dan Identifikasi Metabolit Sekunder dari Ekstrak Kloroform Kulit Akar Tumbuhan Kleinhovia hospita Linn. (Paliasa) dan Uji Toksisitas terhadap Artemia salina Leach*. Tesis tidak diterbitkan. Makassar: Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin.
- Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia*. Jilid 3. Terjemahan oleh Balitbang Kehutanan. Jakarta: Sarana Warna Jaya.


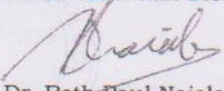
- Hoelzel, S.C.S.M., Vieira, E.R., Glacomelli, S.R., Dalcol, I.I., Zanatta, N., dan Morel, A.F. 2005. *An Unusual Quinolinone Alkaloid From *Waltheria douradinha**. *Phytochemistry* 66(10) : 1163-1167.
- Hutchings, A., Scott, A.H., Lewis, G., Cunningham, A.B. 1996 in : Reid, K.A., Jager, A.K., Light, M.E., Mulholland, D.A., and Van Staden, J. 2005. Phytochemical and pharmacological screening of Sterculiaceae species and isolation of antibacterial compound. *Journal of Ethnopharmacology*. 97(2): 285-291.
- Ilyas, A. 2008. *Isolasi dan Identifikasi Metabolit Sekunder dari Ekstrak Etil Asetat Kulit Akar Tumbuhan *Kleinhovia hospita* Linn. (*Paliasa*) dan Uji Toksisitas terhadap *Artemia salina* Leach*. Tesis tidak diterbitkan. Makassar: Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin.
- Jemal, A., Thun, M.J., Ries, L.A.G., Howe, H.L., Weir, H.K., Center, M.M., Ward, E., Wu, X.C., Ehemann, C., Anderson, A., Ajani, U.A., Kohler, B., Edwards, B.K. 2008. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 100 : 1672-1694.
- Kamiya, K., Saiki, Y., Hama, T., Fujimoto, Y., Endang, H., Umar, M. and Satake, T. 2001. Flavonoid glucuronides from *Helicteres isora*. *Phytochemistry*. 57(2): 297-301.
- Latiff, A. 1997. *Kleinhovia hospita* Linn., In: Hanum, I.F., and Maesen, L.J.G. Van der. *Plant Resources in Southeast Asia*, No.11, The Netherlands, *Auxiliary Plants*. Jakarta: LIPI Press.
- Lyu, S.Y., Rhim, J.Y., Park, W.B. 2005. Antiherpetic activities of flavonoids against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) *in vitro*. *Archives of Pharmacol Research*. 28: 1293-1301.
- Martens, S. and Mithofer, A. 2005. Molecules of Interest: Flavones and Flavone Synthases. *Phytochemistry*. 66: 2399-2407.
- Marzuki, A. 2010. *Profilisasi Bioaktivitas dan Elusidasi Struktur Molekul Prospektif dalam Tumbuhan *Pterospermum celebicum* Miq.* Disertasi tidak diterbitkan. Makassar: Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin.
- Meyer, N., Ferriginii, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, D.E., Nichols, D.E., McLaughlin, J.L. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Med.* (45): 31-34.

- Morel, A.F., Flach, A., Zanatta, N., Ethur, E. M, Mostardeiro, M.A., Gehrke, I.T.S. 1999. A new cyclopeptide alkaloid from the bark of *Waltheria douradinha*. *Tetrahedron Letters*. 40: 9205-9209.
- Noor, A. dan Kumanireng, A. S. 2004. *Isolasi dan Identifikasi Konstituen Organik Tanaman Daun Paliasa, Kleinhovia hospita* Linn. pada Kelarutan Berdasarkan Kelompok Polaritasnya. Suatu Laporan Research. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Hasanuddin Makassar.
- Nurhaedah. 1993. *Pengaruh Ekstrak Metanol Daun Kayu Paliasa (Kleinhovia hospita* Linn.) terhadap Regenerasi Sel-Sel Hati Mencit. Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.
- Porter, L.J., Ma,Z., and Chan, B.G. 1991. Cacao Procyanidins: Major Flavonoids and Identification of Some Minor Metabolites. *Phytochemistry*. 30(5): 1657-1663.
- Prajapathi, N.D., Purohit, S.S., Sharmi, A. K., Kumar, T. 2003. *A Handbook of Medicinal Plants. A Complete Source Book*. Agrobios (India). Shyam Printing Press, Jodhpur, p. 265.
- Price, S.A. and Wilson,L.M. 1991. *Patofisiologi: Konsep Klinik Proses-proses Penyakit*. Edisi 2. Terjemahan oleh: Peter Nugraha. Jakarta: Penerbit EGC.
- Purwaningsih, E. 2010. *Isolasi Senyawa pada Fraksi Ekstrak Kloroform Kulit Akar Tumbuhan Paliasa (Kleinhovia hospita* Linn.) dan Uji Aktivitas Antibakteri *Staphylococcus auerus*, *Streptococcus pneumonia* dan *Escherichia coli*. Skripsi tidak diterbitkan. Makassar: Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.
- Raflizar, Adimunca, C., dan Tuminah, S. 2006. Dekok Daun Paliasa (*Kleinhovia hospita* Linn.) sebagai Obat Radang Hati Akut. *Cermin Dunia Kedokteran*. 50: 10-14.
- Rowinsky, E.K. dan Dorehower, R.C. 1995. Paclitaxel (Taxol). *N.Engl.J.Med*. 332: 1004-1014.
- Ruhmah. 2008. *Isolasi dan Identifikasi Metabolit Sekunder dari Ekstrak n-Heksan Kulit Akar Tumbuhan Kleinhovia hospita* Linn. dan Uji Toksisitasnya terhadap *Artemia salina* Leach. Tesis tidak diterbitkan. Makassar: Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin.

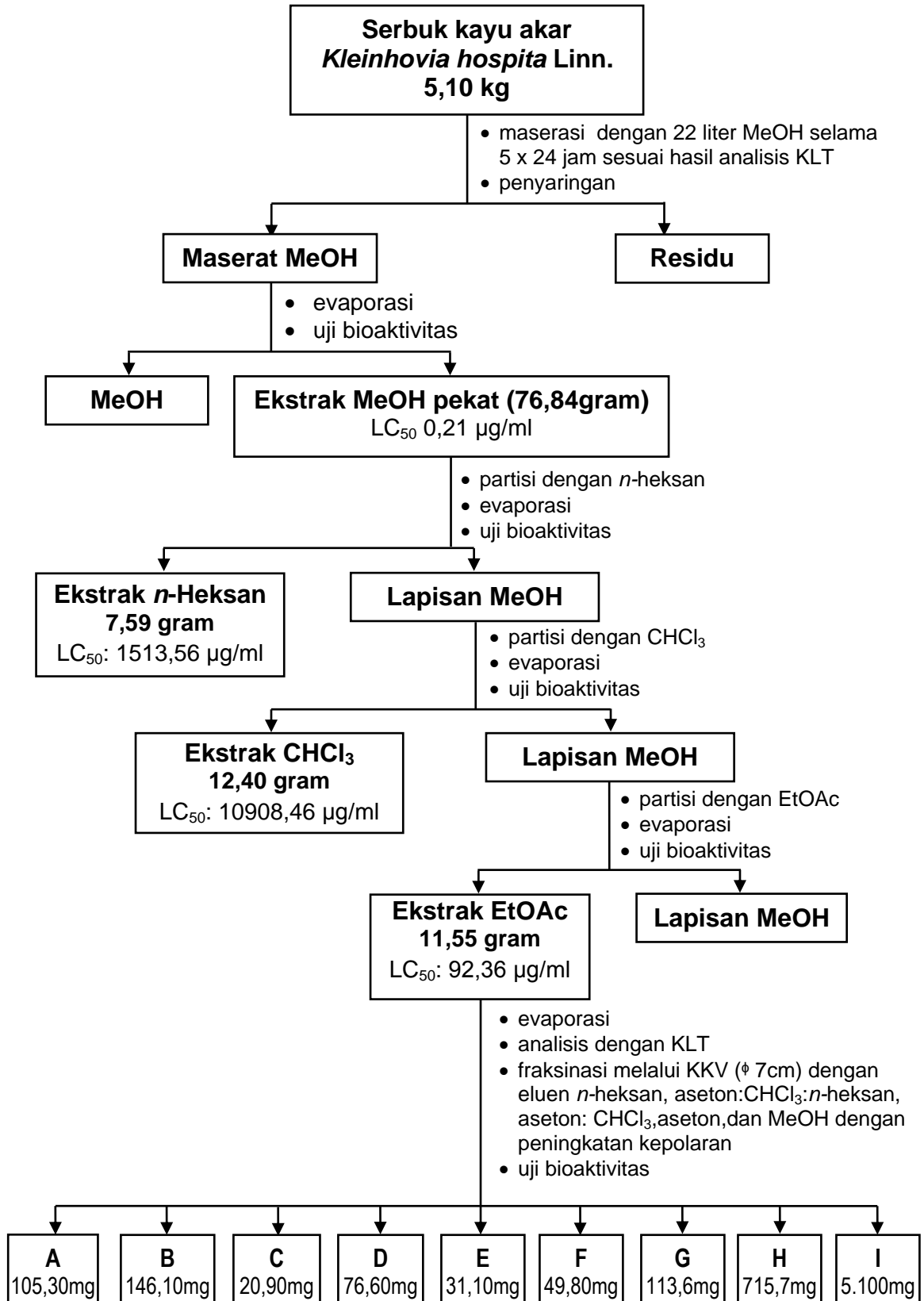
- Salempa, P. 2010. *Bioaktivitas Antibakteri Metabolit Sekunder Prospektif dalam Kayu Akar Pterospermum subpeltatum C.B.Rob.* Disertasi tidak diterbitkan. Makassar: Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin.
- Scogin, R. 1979. Anthocyanins of the Sterculiaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*. 7: 35-36.
- Soekamto, N.H., Noor, A., Dini, I., Rudiyanasyah, Garson, M. 2008. *Anti-leukemia Activity of Oleanen Compound from Bark of Kleinhovia hospita* Linn. Makalah disajikan dalam International Seminar on Chemistry, Bandung, Oktober 30-31.
- Steenis, C.G.G.J. Van. 1975. *Flora untuk Sekolah di Indonesia*. Terjemahan oleh Moeso Surjowinoto. 1988. Jakarta: Pradnya Paramita.
- Suryawati. 1991. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Paliasa Kleinhovia hospita* Linn. Terhadap Hati Hewan Uji Mencit. Skripsi tidak diterbitkan. Ujung Pandang: Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.
- Svoboda, G.H. 1961. Alkaloid of *Vinca rosea* (*Catharanthus roseus*). IX. Extraction and Characterization of leucocristine. *Lloydia*. 24: 173-178.
- Reid, K.A., Jager, A.K., Light, M.E., Mulholland, D.A. dan Staden, J.V. 2005. Phytochemical and Pharmacological Screening of Sterculiaceae Species and Isolation of Antibacterial Compounds. *Journal of Ethnopharmacologi*. 97 : 285-291.
- Taebe, B. 2004. *Standarisasi Ekstrak Daun Paliasa (Kleinhovia hospita* Linn.) sebagai Bahan Baku Sediaan Fitofarmaka. Makalah disajikan dalam seminar hasil penelitian pada Pascasarjana Universitas Hasanuddin. Makassar, 23 Februari.
- Truiti, M.C.T., Ferreira, I.C.P., Zamuner, M.L.M., Nakamura, C.V., Sarragiotto, M.H., and Souza, M.C. 2005. Antiprotozoal and Molluscicidal Activities of Five Brazilian Plants. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 38: 1873-1878.
- Ulfa, M. 2006. *Isolasi, Karakterisasi, dan Uji Bioaktivitas Metabolit Sekunder Ekstrak Kulit Batang Tumbuhan Paliasa (Kleinhovia hospita* Linn.). Tesis tidak diterbitkan. Makassar: Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin.

- USDA-NRCS. 2000. *Classification for *Kleinhovia hospita* Linn.* (Online). (<http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=KLHQ>, diakses 10 Oktober 2010).
- Usman, H. 2002. *Kimia Organik Bahan Alam*. Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Wang, M. and Liu, W. 1987. A Naphtoquinone from *Helicteres Isora*. *Phytochemistry*. 26(2): 578-579.
- Wang, R.F., Yang, X.W., Ma, C.M., Shang, M.Y., Liang, J.Y., Wang, X., Cai, S.Q., and Shoyama, Y. 2003. Alkaloids from the seeds of *Sterculia lychnophora* (Pangdahai). *Phytochemistry*. 63(4): 475-478.
- Wiedemann, B., Lerche, H., Lotter, H., Neszmelyi, A., Wagner, H., and Muller, A.A. 1999. Two novels of triterpenoids from the stemwood of *Herrania cuatrecasana*. *Phytochemistry*. 52: 333-337.
- WHO Media Centre. 2011. *Cancer; Fact sheet N 297*. (Online). (www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en, diakses 27 Agustus 2011).
- Wink, M. 2003. Evolution of Secondary Metabolites from an Ecological and Molecular Phylogenetic Perspective. *Phytochemistry*. 64: 13-19.
- Yuk, J.K., Woo, J.S., Yun, C.Y., Lee, J.S., Kim, J.H., Song, G.Y., Yang, E.J., Hur, I.K., and Kim, I.S. 2007. Effect of lactose- β -sitosterol and β -sitosterol on Ovalbumin-Induced Lung Inflammation in Actively Sensitized Mice. *International Immunopharmacology*. 7: 1517-1527.

Lampiran 1. Hasil Identifikasi Sampel Penelitian

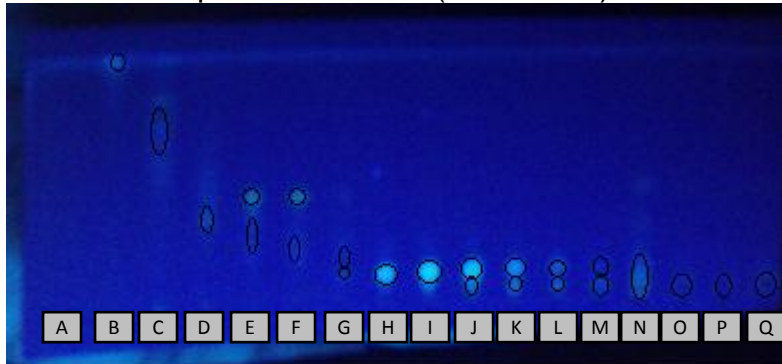
 LIPI	LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA (Indonesian Institute of Sciences) PUSAT PENELITIAN BIOLOGI (Research Center for Biology) Jl. Ir. H. Juanda 18, Bogor 16002, Indonesia P.O Box 208 Bogor Telp. (0251) 321038 - 321041 Fax. 325854		
	Bogor, 22 Maret 2006		
Nomor	: 213 /IPH.1.02/If.8/2006		
Lampiran	: -		
Perihal	: Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan		
Kepada Yth. Bpk./Ibu/Sdr(i). Imran Gafar d/a : Dr. Nunuk Hariani, MS. Jurusan Kimia, FMIPA Univ. Hasanudin Kampus Univ. Hasanudin Tamalanrea, Makassar 90245			
Dengan hormat, Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :			
No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1	-	<i>Kleinhovia hospita</i> L.	Sterculiaceae
Demikian, semoga berguna bagi Saudara.			
Pjh. Kepala Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI,  <u>Dr. Beth Paul Naiola</u> NIP. 320002034			

Lampiran 2. Bagan Ekstraksi dan Isolasi Kayu Akar *Kleinhovia hospita* Linn.

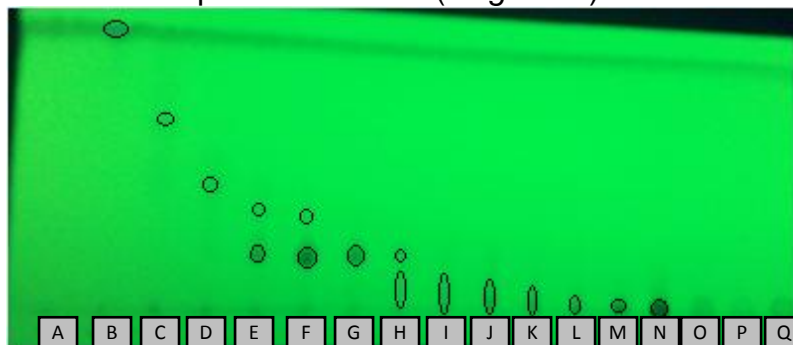


Lampiran 3. Kromatogram Hasil Fraksinasi Ekstrak EtOAc

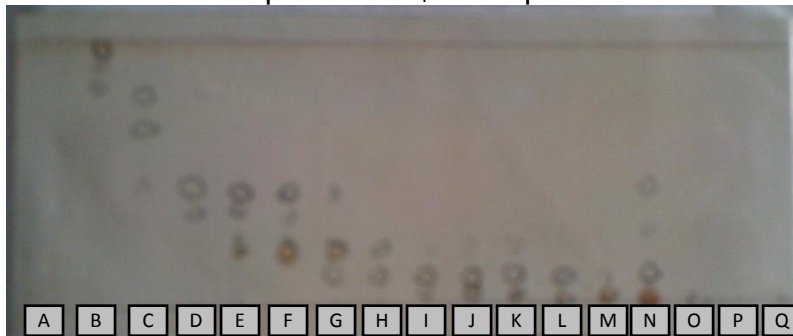
a. Pada lampu UV λ 254 nm (*short wave*)



b. Pada lampu UV λ 365 nm (*long wave*)



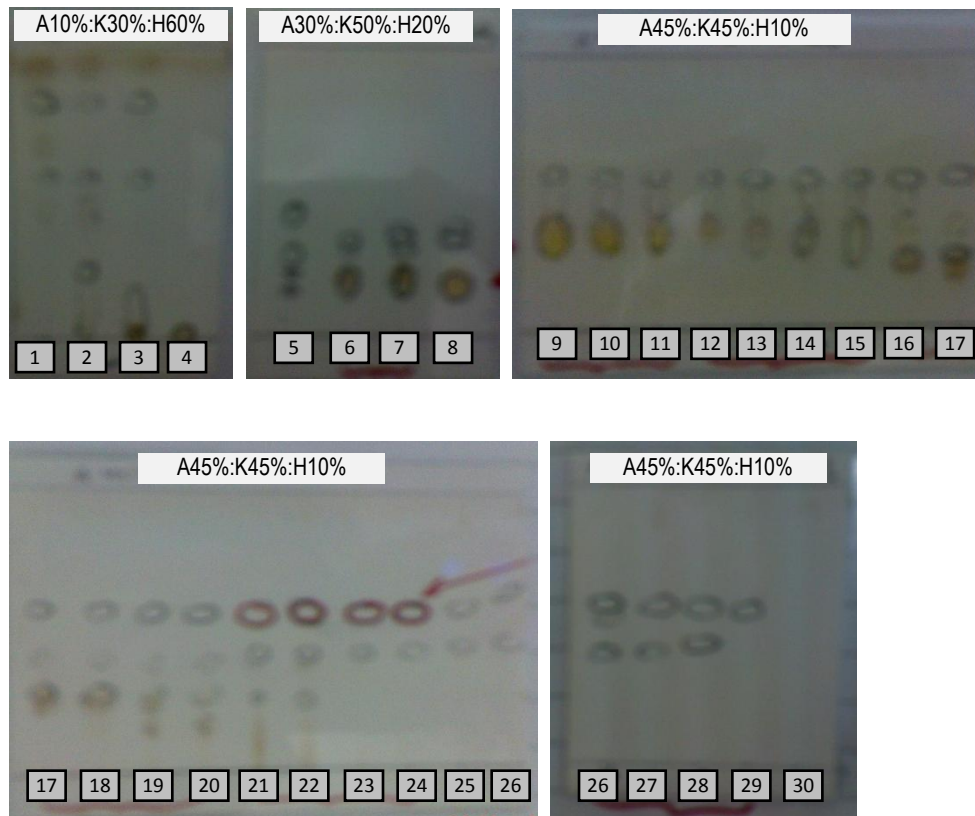
c. Setelah disemprot CeSO_4 dan dipanaskan



Berdasarkan kromatogram di atas maka dapat dilakukan penggabungan fraksi sebagai berikut :

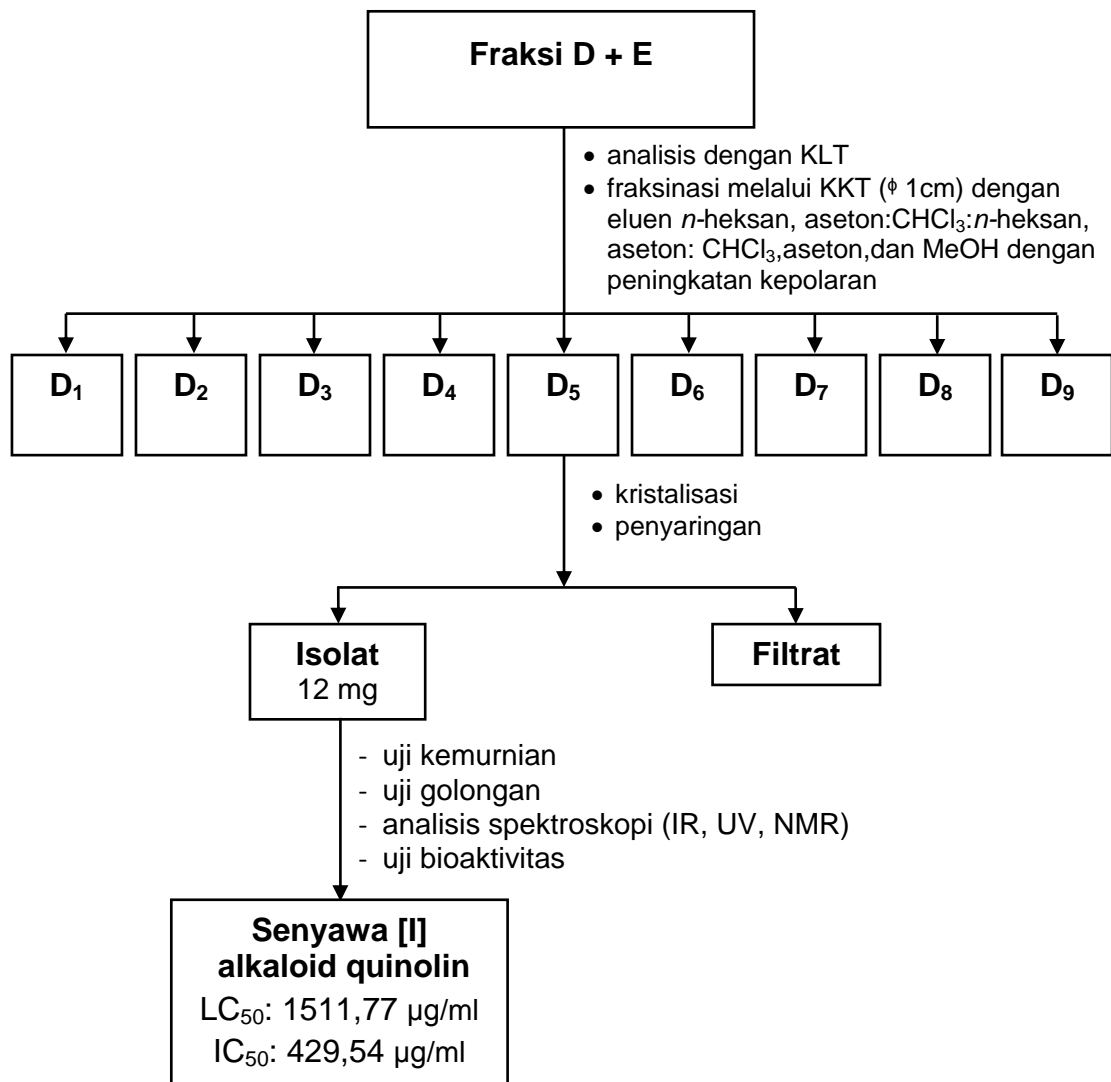
- | | |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| A : fraksi B | F : fraksi H |
| B : fraksi C | G : gabungan fraksi I dan J |
| C : fraksi D | H : gabungan fraksi K dan L |
| D : gabungan fraksi E dan F | I : gabungan fraksi M,N,O,P dan Q |
| E : fraksi G | |

Lampiran 4. Kromatogram Hasil Fraksinasi Fraksi D+E

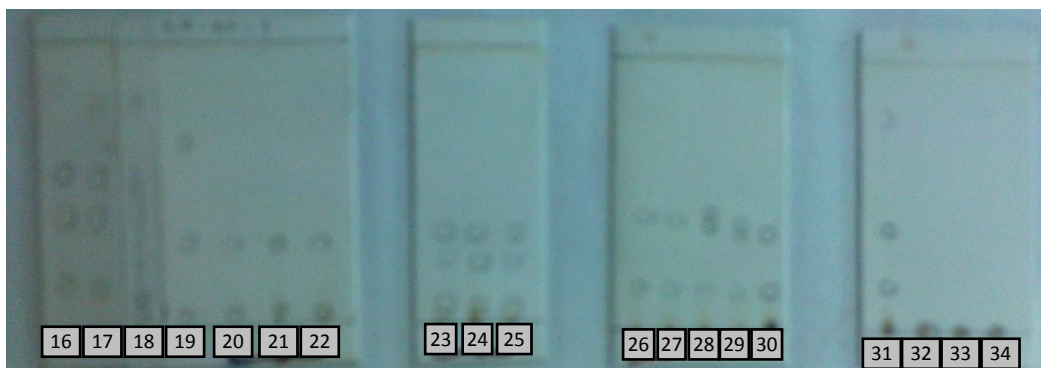
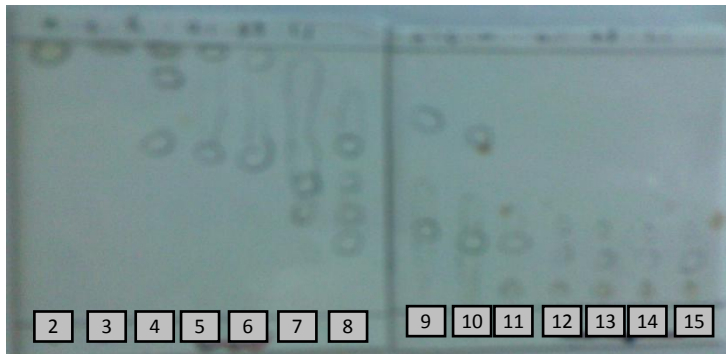


Berdasarkan kromatogram di atas maka dapat dilakukan penggabungan fraksi sebagai berikut :

- | | |
|--|--|
| D ₁ : fraksi 1 | D ₆ : gabungan fraksi 12 – 15 |
| D ₂ : gabungan fraksi 2 dan 3 | D ₇ : gabungan fraksi 16 – 20 |
| D ₃ : gabungan fraksi 4 dan 5 | D ₈ : gabungan fraksi 21 – 24 |
| D ₄ : gabungan fraksi 6 dan 7 | D ₉ : gabungan fraksi 25 – 30 |
| D ₅ : gabungan fraksi 8 – 11 | |

Lampiran 5. Bagan Isolasi Fraksi D dan E.

Lampiran 6. Kromatogram Hasil Fraksinasi Fraksi I.



Berdasarkan kromatogram di atas maka dapat dilakukan penggabungan fraksi sebagai berikut :

I_1 : fraksi 2

I_9 : gabungan fraksi 16-18

I_2 : fraksi 3

I_{10} : fraksi 19

I_3 : fraksi 4

I_{11} : gabungan fraksi 20-22

I_4 : gabungan fraksi 5 dan 6

I_{12} : gabungan fraksi 23-29

I_5 : fraksi 7

I_{13} : gabungan fraksi 30-31

I_6 : fraksi 8

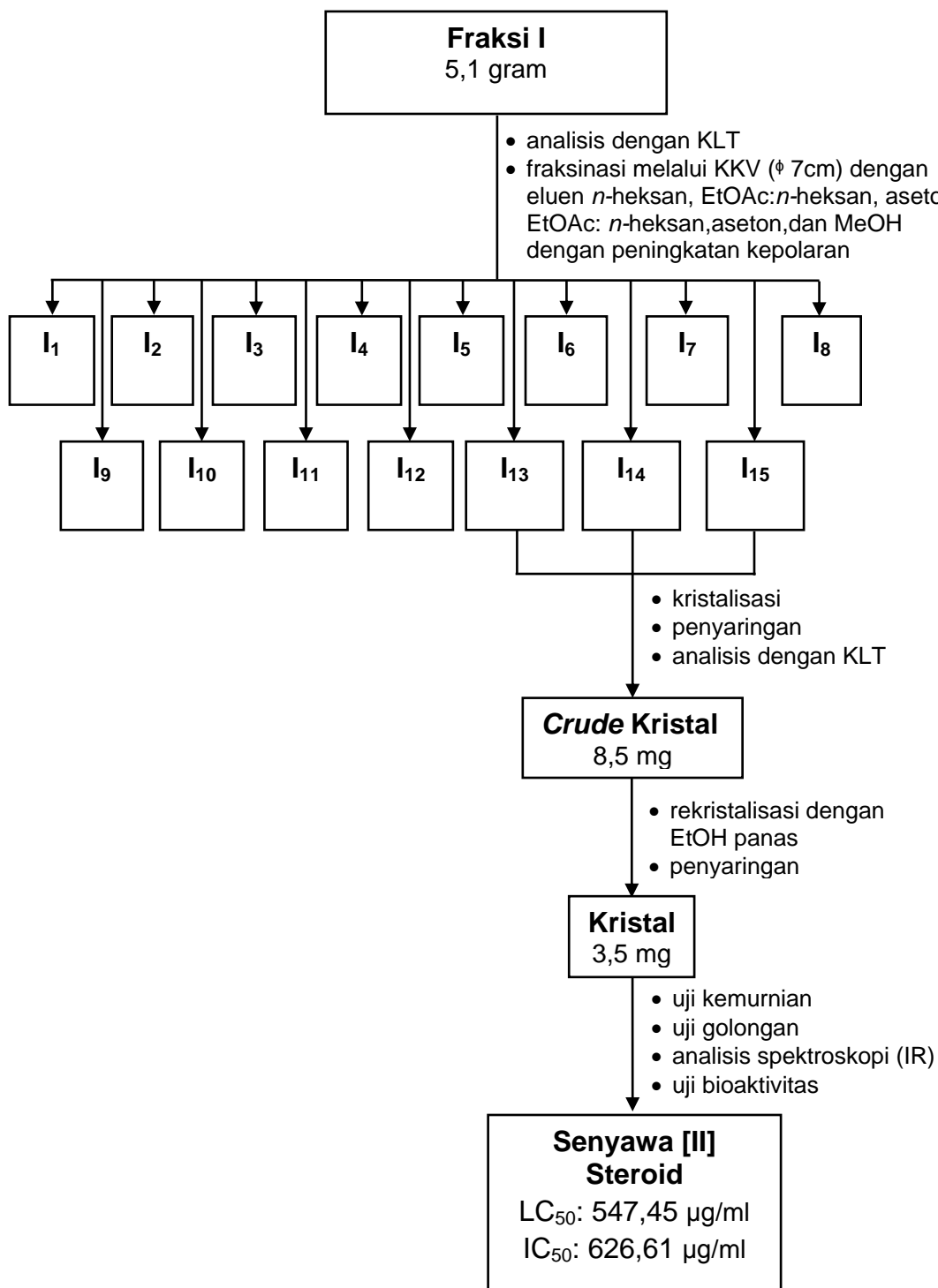
I_{14} : gabungan fraksi 32-37

I_7 : gabungan fraksi 9-11

I_{15} : gabungan fraksi 38-42

I_8 : gabungan fraksi 12-15

Lampiran 7. Bagan Isolasi Fraksi I.



Lampiran 8. Prosedur Uji Bioaktivitas *Brine Shrimp Lethality Test* (Meyer *et al.*, 1982)

A. Penyiapan Larutan Sampel (1000 ppm)

1. Sampel (ekstrak tumbuhan, senyawa murni atau hasil sintesis) ditimbang sebanyak 1,0 mg sampel dalam tabung ependorf, dilarutkan dalam 100 μL DMSO sambil diaduk.
2. Larutan sampel diencerkan dengan 150 μL aquades sehingga volume total menjadi 250 μL . Selanjutnya 200 μL larutan ini diencerkan dengan 600 μL akuades sehingga volume total menjadi 800 μL dan konsentrasi menjadi :

$$\frac{\frac{200\mu\text{L}}{250\mu\text{L}} \times 1\text{mg}}{800\mu\text{L}} = \frac{0,8\text{mg}}{800\mu\text{L}} = 1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

B. Penyiapan Larutan Kontrol

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

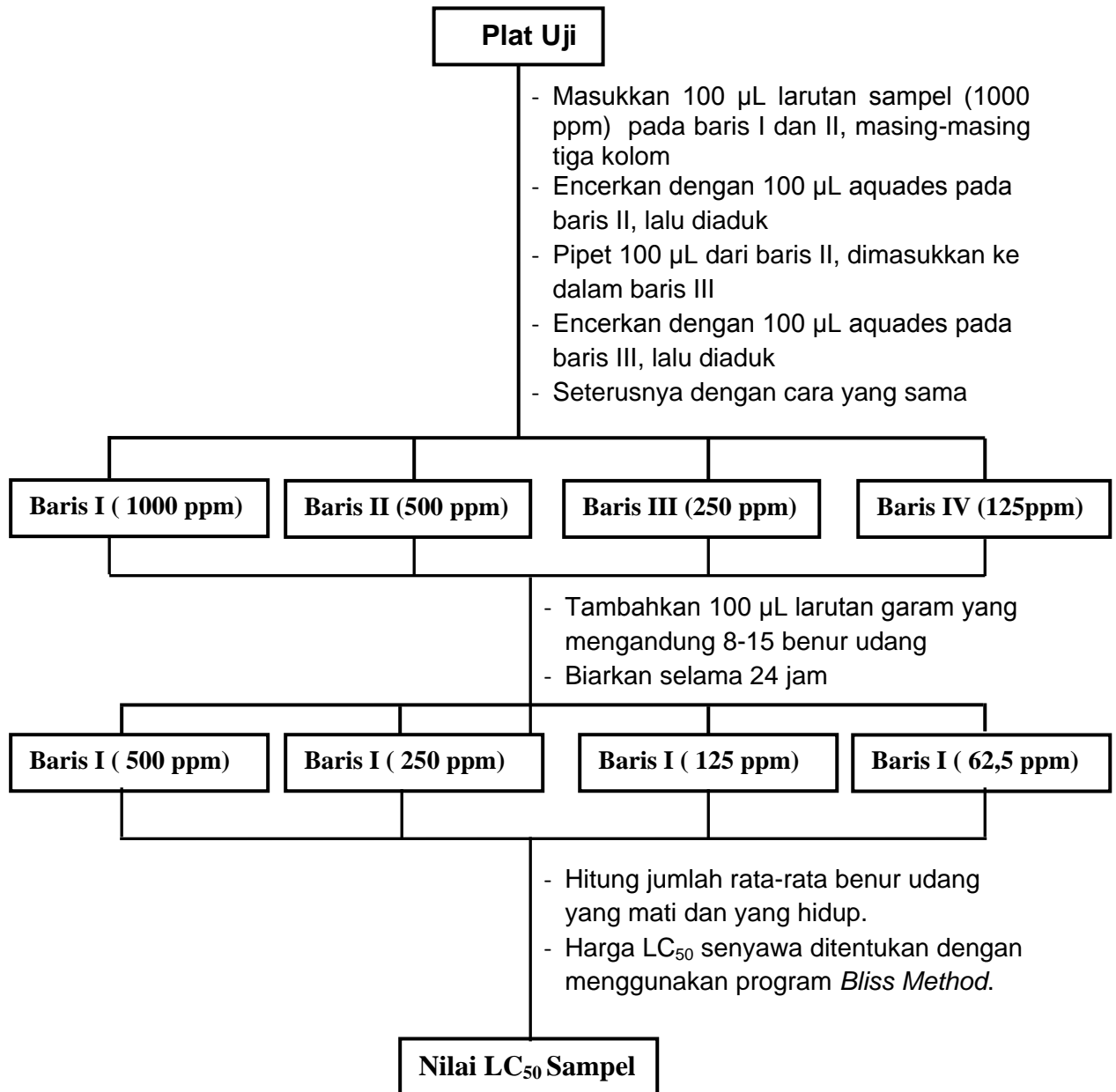
C. Penyemaian Benur Udang

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

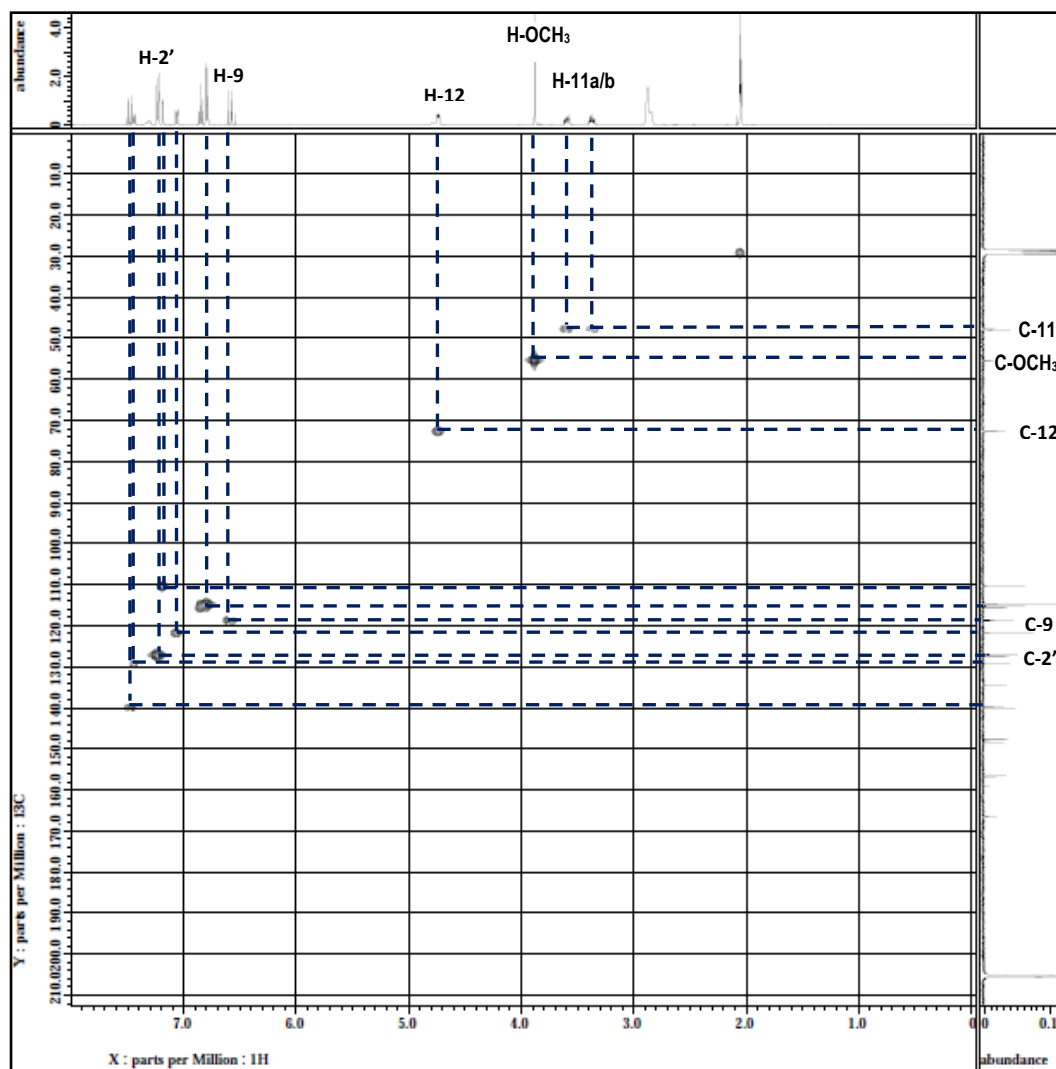
D. Prosedur Uji Metode Mayer

1. Dua plat mikro standar disiapkan masing-masing untuk plat uji dan plat kontrol.
2. Ke dalam baris I dan II masing-masing tiga kolom dimasukkan 100 μ L larutan sampel pada plat uji dan 100 μ L larutan control pada plat kontrol.
3. Larutan pada baris II diencerkan dengan 100 μ L aquades dan diaduk, kemudian dipipet kembali 100 μ L dimasukkan ke dalam baris III diencerkan kembali dengan 100 μ L aquades sambil diaduk dan seterusnya dengan cara yang sama sampai baris terakhir.
4. Selanjutnya, ke dalam larutan sampel pada plat uji dan larutan kontrol pada plat kontrol ditambahkan 100 μ L larutan garam yang mengandung 8-15 benur udang, kemudian dibiarkan selama 24 jam sehingga konsentrasi larutan untuk masing-masing baris sebagai berikut, baris I = 500 ppm, baris II = 50 % baris I, baris III = 50 % baris II dan seterusnya.
5. Setelah itu, dihitung jumlah rata-rata benur udang yang mati dan yang hidup untuk setiap baris dari plat uji.
6. Harga LC_{50} senyawa ditentukan dengan menggunakan program *Bliss Method*.

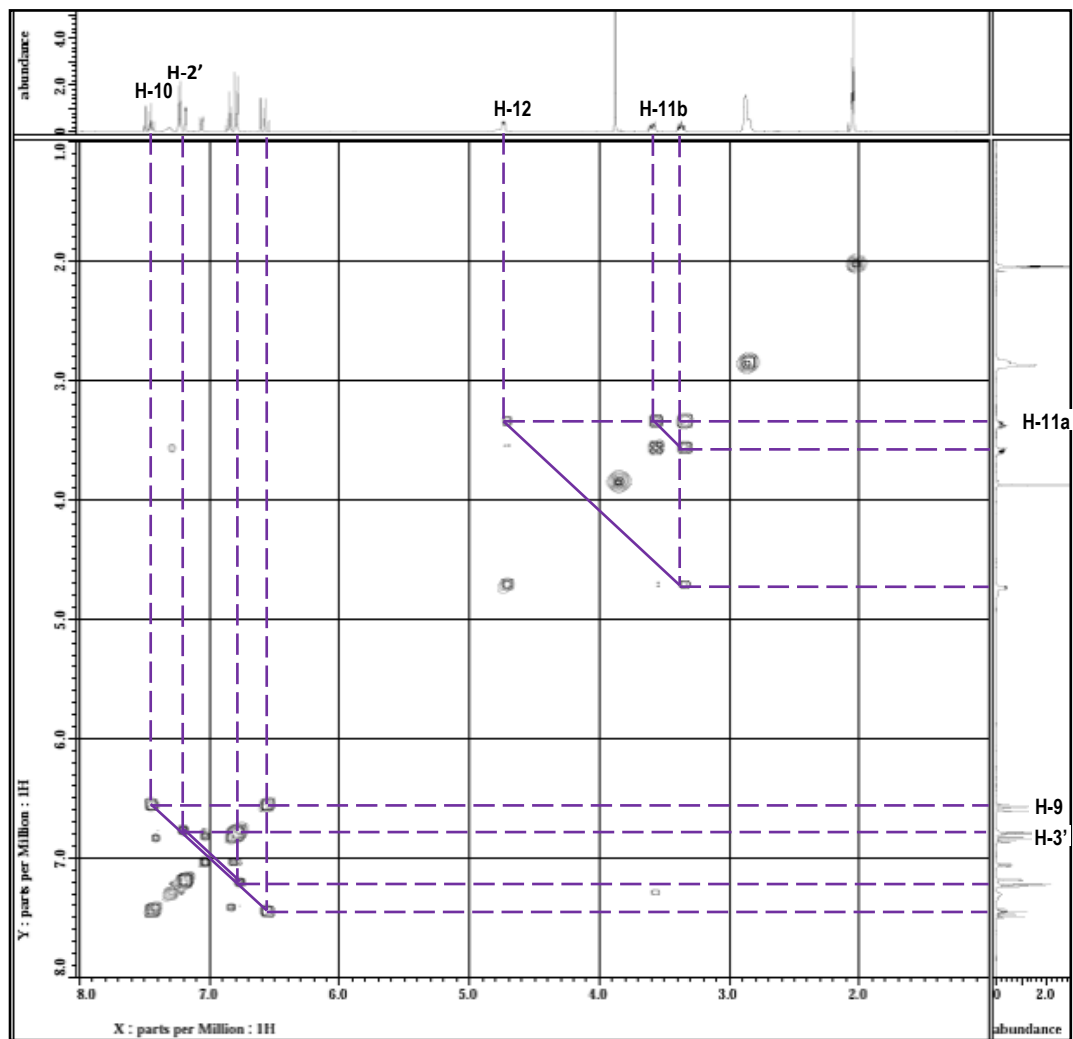
Lampiran 9. Bagan Kerja Uji Bioaktivitas Pada *A. salina* dengan Metode Mayer



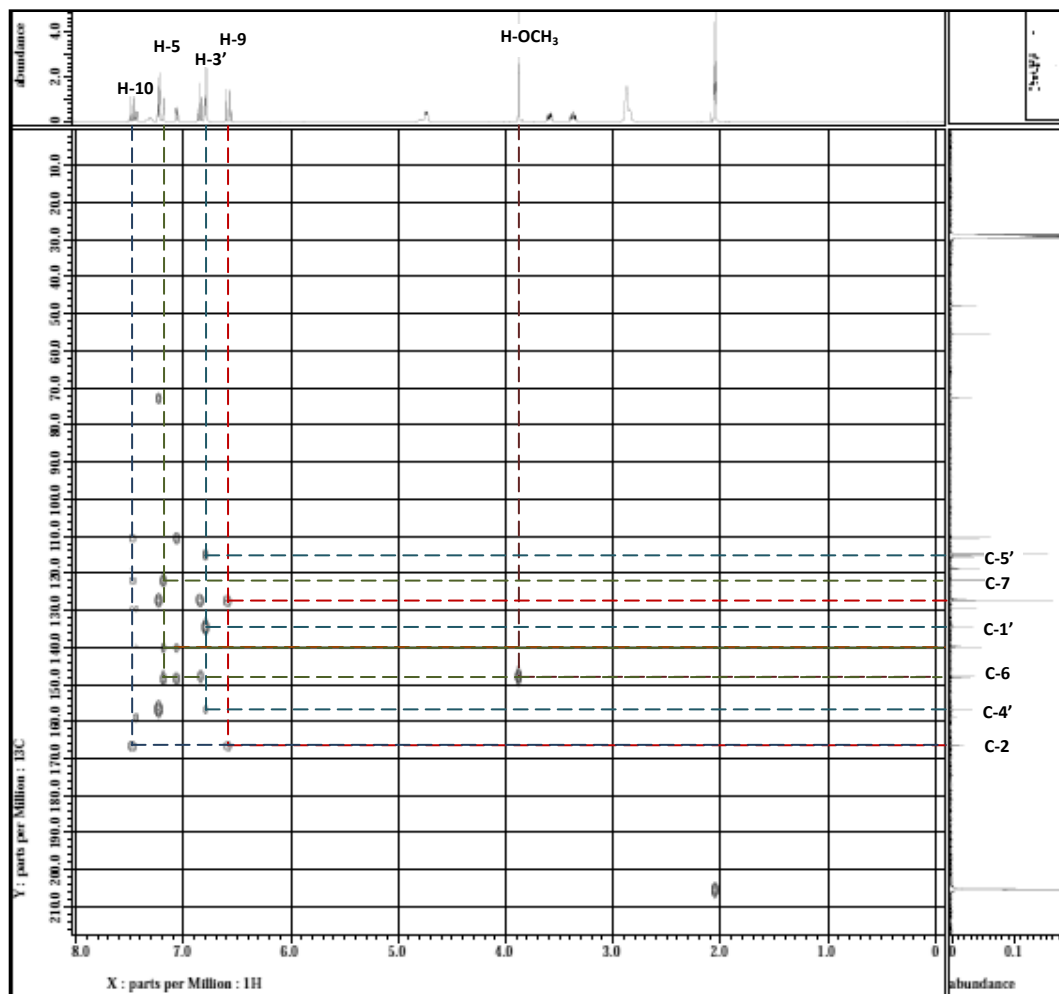
Lampiran 10. Spektrum HMQC senyawa [I]



Lampiran 11. Spektrum COSY senyawa [I]



Lampiran 12. Spektrum HMBC Senyawa [I]



Lampiran 13. Prosedur uji bioaktivitas terhadap sel HeLa.

Uji sitotoksitas terhadap *cell lines* dilakukan dengan tahapan :

- a. Menumbuhkan *cell lines* dari penyimpanan dalam nitrogen cair.

Sel beku dari nitrogen cair dibiarkan pada suhu kamar sampai mencair sebagian, kemudian dimasukkan dalam tabung konikal 15 ml, dan ditambah 10 ml media pencuci lalu dikocok. Setelah itu disentrifus 750 g selama 7 menit. Pelet diambil ditambahkan dengan media kultur, kemudian sel dimasukkan dalam flask. Semua kegiatan tersebut dilakukan secara aseptis dalam *laminar airflow*. Sel kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C dengan aliran CO₂ 5%. Perkembangan sel diamati tiap hari dan jika media mulai menguning diganti dengan media baru.

- b. Uji sitotoksitas dengan MTT assay.

Jika sel sudah tumbuh memenuhi flask, media pada sel HeLa atau sel T47D diambil, dicuci dengan PBS secukupnya. Selanjutnya sel dilepas dari dinding flask (*scapper*) menggunakan 0,5 ml tripsin 0,05%. Flask dikocok perlahan sampai sel terlepas semua. Suspensi sel diinkubasi 2-5 menit di inkubator CO₂ pada 37 °C. Selanjutnya suspensi sel tersebut dimasukkan dalam tabung *conical* 15 ml dan ditambahkan dengan media kultur sebanyak 5 ml. Jumlah sel dihitung dengan *hemocytometer* dan disuspensikan dalam media kultur sampai diperoleh kepadatan sel 1×10^4 sebanyak 100 µl pada setiap sumuran. Selanjutnya diinkubasi selama 12 – 24 jam pada suhu 37 °C di inkubator CO₂.

Setiap sumuran dimasukkan 100 µl sampel yang dilarutkan dalam media kultur yang mengandung DMSO 0,05% dengan berbagai konsentrasi menggunakan 3 kali ulangan. Sumuran yang tersisa digunakan untuk kontrol positif yang berisi sel tanpa penambahan sampel, dan kontrol negatif hanya mengandung media kultur. Selanjutnya diinkubasi 12- 24 jam pada suhu 37 °C di inkubator CO₂. Untuk sel HeLa dan T47D, media diambil, kemudian masing-masing sumuran ditambahkan 110 µl media kultur yang mengandung MTT. Kultur diinkubasi 4 jam pada suhu 37°C di inkubator CO₂. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formazan yang memberikan warna ungu. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 100 ml SDS 10% dalam HCl 0,01 N, kemudian diinkubasi pada suhu kamar semalam kemudian dibaca dengan menggunakan ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm.

Viabilitas sel dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ sel hidup} = (\text{abs P} - \text{abs M}) / (\text{abs K} - \text{abs M}) \times 100\%$$

abs P = absorbansi sel dengan perlakuan

abs M = absorbansi media

abs K = absorbansi kontrol sel

Nilai IC₅₀ ditentukan dengan analisis probit pada program SPSS 16. Nilai konsentrasi diubah ke dalam nilai log konsentrasi dan nilai prosentase viabilitas sel diubah ke dalam nilai probit. Nilai IC₅₀ merupakan nilai antilog pada saat nilai probit 50.

Lampiran 14. Hasil uji sitotoksitas senyawa [I] terhadap sel HeLa

```

PROBIT prosentaseviabilitas OF respon WITH logkadar
  /LOG NONE
  /MODEL PROBIT
  /PRINT FREQ CI

  /CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).

```

Probit Analysis

		Notes	
Output Created			09-Oct-2011 16:47:19
Comments			
Input	Active Dataset	DataSet0	
	Filter	<none>	
	Weight	<none>	
	Split File	<none>	
	N of Rows in Working Data File		7
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.	
	Cases Used	Statistics are based on all cases with valid data for all variables in the model.	
Syntax		PROBIT prosentaseviabilitas OF respon WITH logkadar /LOG NONE /MODEL PROBIT /PRINT FREQ CI /CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).	
Resources	Processor Time		00:00:01.591
	Elapsed Time		00:00:01.498

Data Information

		N of Cases
Valid		7
Rejected	Missing	0
	Number of Responses >	0
	Number of Subjects	0
Control Group		0

Convergence Information

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	12	Yes

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a logkadar	-.686	.103	-6.629	.000	-.889	-.483
Intercept	1.806	.145	12.416	.000	1.661	1.952

a. PROBIT model: $\text{PROBIT}(p) = \text{Intercept} + \text{BX}$

Chi-Square Tests

	Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT Pearson Goodness-of-Fit Test	1.925	5	.859 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

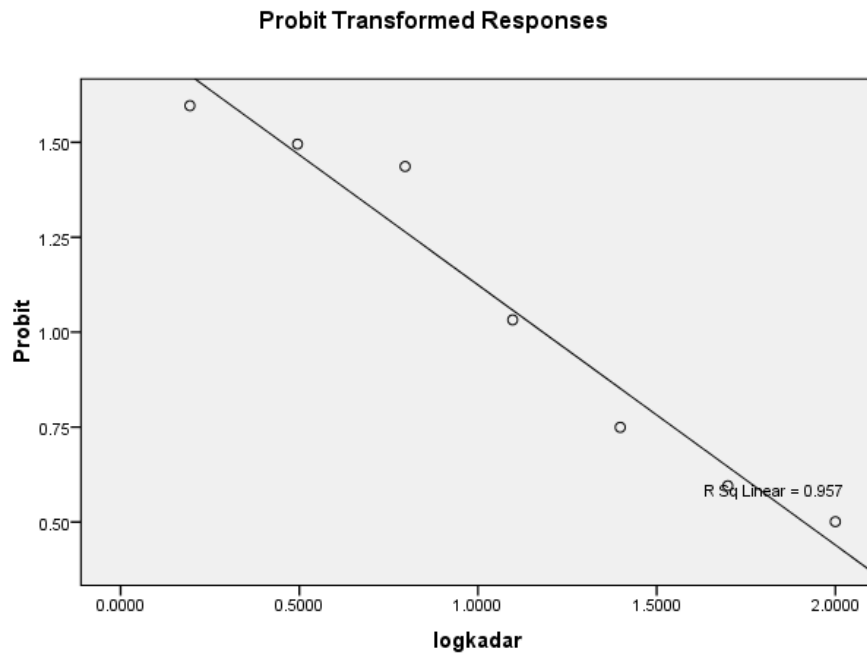
b. Since the significance level is greater than .150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Cell Counts and Residuals

	Number	Logkadar	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PROBIT	1	2.000	100	69	66.799	2.384	.668
	2	1.699	100	72	73.919	-1.487	.739
	3	1.398	100	77	80.162	-2.838	.802
	4	1.097	100	85	85.403	-.498	.854
	5	.796	100	92	89.623	2.829	.896
	6	.495	100	93	92.879	.377	.929
	7	.194	100	94	95.288	-.808	.953

Confidence Limits

	Probabil ity	95% Confidence Limits for logkadar		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	0.01	6.024	4.933	8.024
	0.02	5.627	4.625	7.460
	0.03	5.375	4.430	7.103
	0.04	5.185	4.283	6.834
	0.05	5.031	4.164	6.616
	0.06	4.900	4.062	6.430
	0.07	4.784	3.973	6.267
	0.08	4.681	3.893	6.121
	0.09	4.588	3.820	5.988
	0.1	4.501	3.753	5.866
	0.15	4.144	3.475	5.360
	0.2	3.860	3.254	4.959
	0.25	3.616	3.064	4.615
	0.3	3.398	2.893	4.306
	0.35	3.195	2.735	4.021
	0.4	3.002	2.584	3.750
	0.45	2.816	2.437	3.489
	0.5	2.633	2.292	3.233
	0.55	2.450	2.145	2.978
	0.6	2.264	1.995	2.720
	0.65	2.071	1.837	2.456
	0.7	1.869	1.667	2.183
	0.75	1.650	1.473	1.896
	0.8	1.406	1.238	1.598
	0.85	1.122	.923	1.290
	0.9	.765	.471	.959
	0.91	.679	.357	.884
	0.92	.585	.231	.805
	0.93	.482	.091	.719
	0.94	.367	-.067	.625
	0.95	.235	-.248	.518
	0.96	.081	-.462	.394
	0.97	-.108	-.727	.243
	0.98	-.361	-1.080	.043
	0.99	-.758	-1.639	-.269



Persamaan regresi probit:

$$Y = 1.806 - 0.686x$$

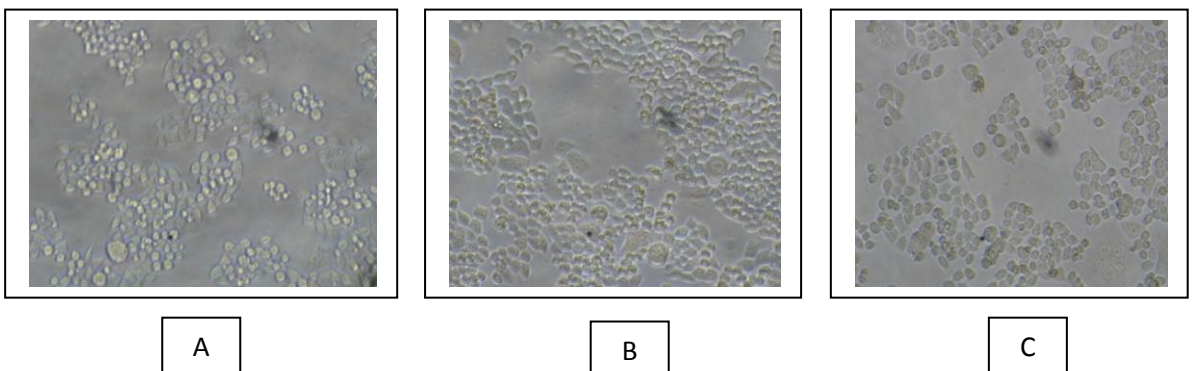
Penentuan nilai IC50

Nilai probit 50 = 2.633

Nilai IC 50 adalah antilog 2.633

Diperoleh : **429,536 $\mu\text{g/mL}$**

Gambar sel dengan perlakuan YP1 pada konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ (A) dan 1,5625 $\mu\text{g/mL}$ (B), serta kontrol sel (tanpa perlakuan)(C)



Gambar sel menunjukkan koloni sel pada konsentrasi YP1 100 $\mu\text{g/mL}$ (A) lebih sedikit daripada koloni sel pada konsentrasi 1,5625 $\mu\text{g/mL}$ (B).

Lampiran 15. Hasil uji sitotoksisitas senyawa [III] terhadap sel HeLa

```

PROBIT prosentaseviabilitas OF respon WITH logkadar
/LOG NONE
/MODEL PROBIT
/PRINT FREQ CI

/CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).

```

Probit Analysis

Notes

Output Created		09-Oct-2011 17:01:11
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet0
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	7
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics are based on all cases with valid data for all variables in the model.
Syntax		PROBIT prosentaseviabilitas OF respon WITH logkadar /LOG NONE /MODEL PROBIT /PRINT FREQ CI /CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
Resources	Processor Time	00:00:01.591
	Elapsed Time	00:00:01.498

Data Information

		N of Cases
Valid		7
Rejected	Missing	0
	Number of Responses > Number of Subjects	0
Control Group		0

Convergence Information

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	12	Yes

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a logkadar	-.677	.107	-6.300	.000	-.888	-.466
Intercept	1.893	.152	12.417	.000	1.741	2.046

a. PROBIT model: $\text{PROBIT}(p) = \text{Intercept} + BX$

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	2.449	5	.784 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

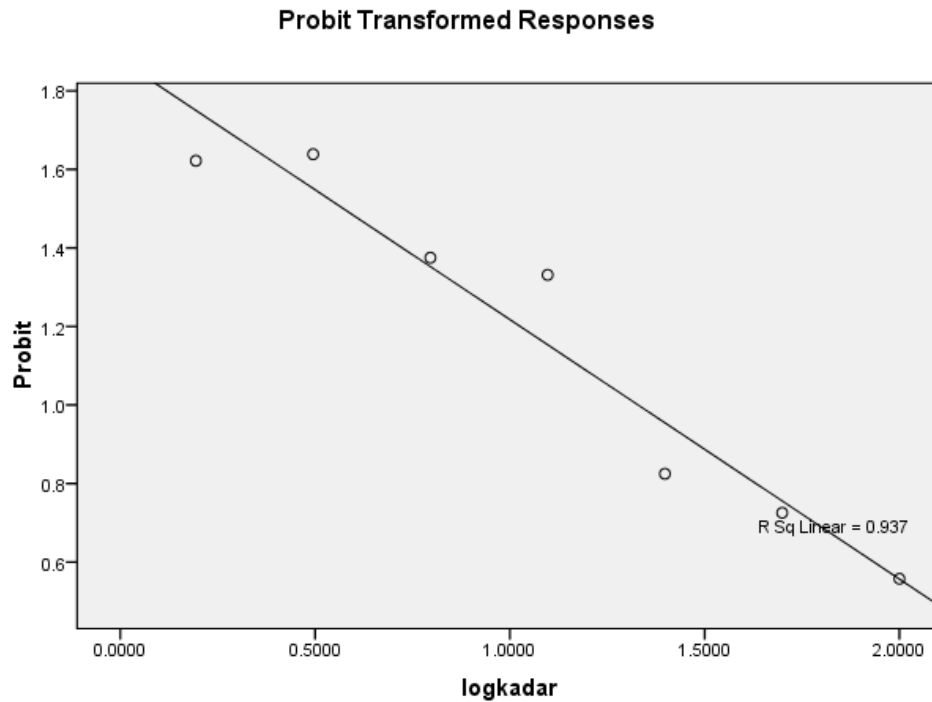
b. Since the significance level is greater than .150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Cell Counts and Residuals

	Number	Logkadar	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PROBIT	1	2.000	100	71	70.516	.623	.705
	2	1.699	100	77	77.129	-.539	.771
	3	1.398	100	80	82.818	-3.293	.828
	4	1.097	100	91	87.509	3.337	.875
	5	.796	100	92	91.223	.322	.912
	6	.495	100	95	94.043	.891	.940
	7	.194	100	95	96.099	-1.340	.961

Confidence Limits

	Probabil ity	95% Confidence Limits for logkadar		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	0.01	6.232	5.052	8.470
	0.02	5.830	4.744	7.886
	0.03	5.574	4.548	7.516
	0.04	5.382	4.401	7.238
	0.05	5.226	4.282	7.011
	0.06	5.093	4.180	6.819
	0.07	4.976	4.090	6.650
	0.08	4.872	4.010	6.499
	0.09	4.777	3.937	6.361
	0.1	4.689	3.870	6.234
	0.15	4.327	3.593	5.711
	0.2	4.039	3.371	5.295
	0.25	3.793	3.181	4.938
	0.3	3.571	3.010	4.618
	0.35	3.366	2.852	4.322
	0.4	3.171	2.701	4.042
	0.45	2.982	2.554	3.771
	0.5	2.797	2.409	3.505
	0.55	2.611	2.263	3.239
	0.6	2.422	2.114	2.971
	0.65	2.227	1.957	2.696
	0.7	2.022	1.789	2.410
	0.75	1.800	1.601	2.107
	0.8	1.554	1.376	1.786
	0.85	1.266	1.076	1.448
	0.9	.904	.631	1.092
	0.91	.816	.515	1.014
	0.92	.721	.387	.932
	0.93	.617	.244	.843
	0.94	.500	.082	.747
	0.95	.367	-.104	.638
	0.96	.211	-.325	.513
	0.97	.019	-.598	.360
	0.98	-.237	-.963	.160
	0.99	-.639	-1.541	-.154



Persamaan regresi probit:

$$Y = 1.893 - 0.677x$$

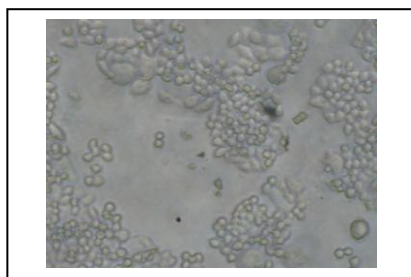
Penentuan nilai IC50

ilai probit 50 = 2.797

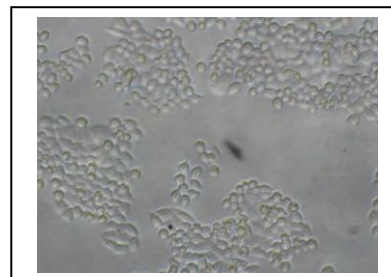
Nilai IC 50 adalah antilog 2.797

Diperoleh : **626,614 $\mu\text{g/mL}$**

Gambar sel dengan perlakuan YP2 pada konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ (A) dan 1,5625 $\mu\text{g/mL}$ (B).



A



B

Gambar sel menunjukkan koloni sel pada konsentrasi YP2 100 $\mu\text{g/mL}$ (A) lebih sedikit daripada koloni sel pada konsentrasi 1,5625 $\mu\text{g/mL}$ (B).