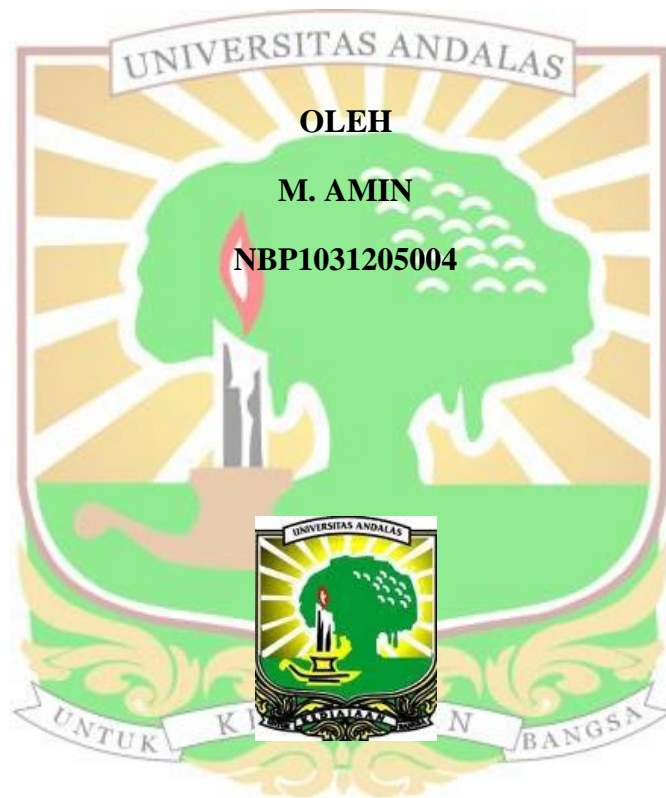


KAJIAN METABOLIT SEKUNDER DARI KULIT BATANG
Callicarpa arborea ROXB DAN UJI
BIOAKTIFITAS

DISERTASI



PROGRAM PASCASARJANA
FAKULTAS MATEMATIKA dan ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2016

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

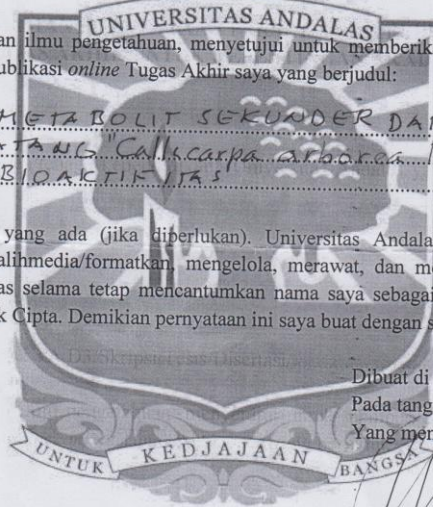
Saya mahasiswa/dosen/tenaga kependidikan* Universitas Andalas yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama lengkap : M. AMIN
No. BP/NIM/NIDN : 1031205004
Program Studi : ILMU KIMIA
Fakultas : FIMIPA
Jenis Tugas Akhir : TA D3/Skripsi/Tesis/Disertasi/.....**

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Andalas hak atas publikasi online Tugas Akhir saya yang berjudul:

KAJIAN METABOLIT SEKUNDER DARI
KULIT BATANG *Callicarpa arborea Roxb*
DAN UJI BIODAKTIFITAS

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Universitas Andalas juga berhak untuk menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola, merawat, dan mempublikasikan karya saya tersebut di atas selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta. Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.



Dibuat di PADANG
Pada tanggal 23-8-2016
Yang menyatakan,

M. Amin
(M. AMIN)

* pilih sesuai kondisi

** termasuk laporan penelitian, laporan pengabdian masyarakat, laporan magang, dll

Judul Penelitian: Kajian Metabolit Sekunder dari Kulit Batang
Callicarpa arborea Roxb dan Uji Bioaktivitas


Nama : M. Amin


NBP : 1031205004

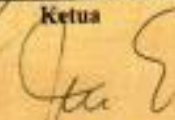
Program Studi : Doktor Ilmu Kimia


Disertasi ini telah dipertahankan di depan Tim Penguji Ujian Doktor Program Studi Kimia pada Program Pascasarjana Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas dan dinyatakan lulus pada tanggal 19 April 2016.

Menyetujui Komisi Pembimbing



Prof. Dr. Yunazar Manjang
Ketua


Prof. Dr. Sanusi Ibrahim
Anggota


Dr. Mal Efdi
Anggota


Dr. Adlis Santoni
Anggota

Koordinator Pascasarjana
Fakultas MIPA


Prof. Dr. Hermansyah Aziz, M. Sc
NIP 195301261979031002

Koordinator Pascasarjana
Bidang Kimia


Dr. Zulkarnaini Chaidir, MS
NIP 195311111984031002


Dekan FMIPA

Prof. Dr. Syafrizal Sy
NIP 196708071993091001

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Dengan ini menyatakan bahwa disertasi yang saya tulis berjudul "Kajian Senyawa Metabolit Sekunder Dari Kulit Batang *Callicarpa Arborea* Roxb Dan Uji Bioaktivitas" adalah karya saya sendiri dan bukan merupakan karya plagiat dari orang lain kecuali kutipan yang sumbernya dicantumkan.

Jika dikemudian hari pernyataan yang saya buat ini tidak benar maka status kelulusan dan gelar yang saya peroleh menjadi batal.

Padang, April 2016

Yang Menyatakan



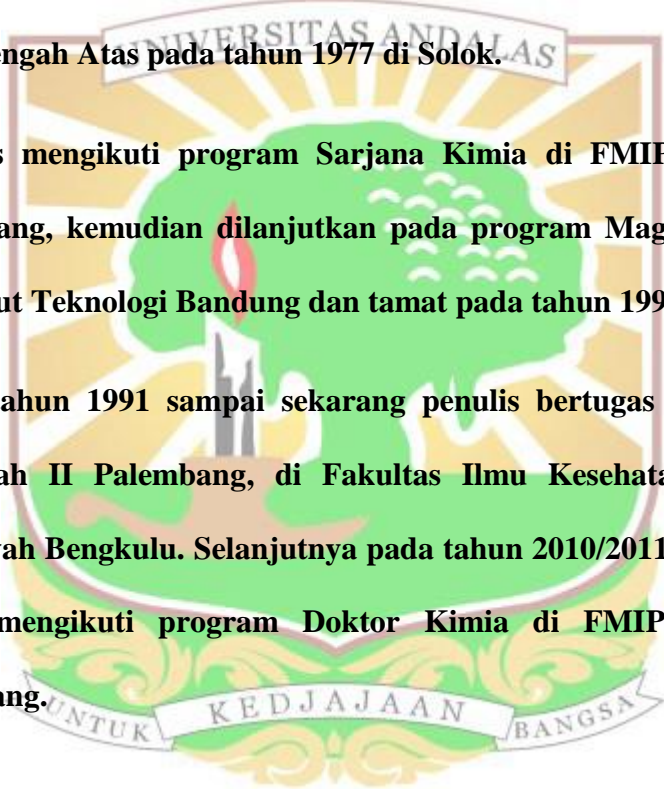
M. Amin
NBP 1031205004

RIWAYAT HIDUP

Penulis lahir pada tanggal 6 Oktober 1957 di Tanjung Balai Karimun Propinsi Riau Kepulauan sebagai anak ke tiga dari enam bersaudara dari ayah Djabar Rahimy dan ibu Nursimah. Penulis menamatkan Sekolah Dasar pada tahun 1970 di Solok, Sekolah Menengah Pertama pada tahun 1973 dan Sekolah Menengah Atas pada tahun 1977 di Solok.

Penulis mengikuti program Sarjana Kimia di FMIPA Universitas Andalas, Padang, kemudian dilanjutkan pada program Magister Kimia di FMIPA Institut Teknologi Bandung dan tamat pada tahun 1997.

Pada tahun 1991 sampai sekarang penulis bertugas sebagai dosen PNSD Wilayah II Palembang, di Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Bengkulu. Selanjutnya pada tahun 2010/2011 mendapatkan kesempatan mengikuti program Doktor Kimia di FMIPA Universitas Andalas, Padang.



PERSEMBAHAN

**..... kami tumbuhkan
pada bumi segala sesuatu
menurut ukuran
(Q, S, Al Hijr, 19)**



**ku persembahkan tulisan ini
kepada isteriku tercinta nenny dan
anakku tersayang agni dian
permata serata ayah bunda dan
mertua**

**perhatian, pengertrian dan
pengorbanannya.....
kan kuingat selalu**

Study of Secondary Metabolite from Stem Bark of *Callicarpa Arborea* Roxb and Bioactivity Assay

By : M. Amin

**(Advisers : Prof. Dr. Yunazar Manjang, Prof. Dr. Sanusi Ibrahim,
Dr. Mai Efdi, and Dr. Adlis Santoni)**

SUMMARY

Secondary metabolites in living cells have vital functions. They can regulate growth, defend self, kill competitors, and drag insects or animals to breed. Secondary metabolites for human have been used as drugs, perfume, cosmetics from ages. Currently, secondary metabolites are used for drug-model manufacturing included for herbicides and insecticides. Epidemiological studies have shown inverse relationship among fruit, vegetables, and spices consumption for cancer risks and cardiovascular diseases. The protection effect is mostly caused by the presence of secondary metabolites in plant tissue.

Callicarpa arborea Roxb, included in Verbenaceae family, in Bengkulu is known as “ketepung daun lebar”, in England “Physic Nut”, and its popular name is Fresch Mulberry of Northern Circarears. This plant is used in Bengkulu as traditional medicine for hepatitis and diabetes, while in India and Nepal is used for fever, headache, gastric disease, skin, and scorpion’s bites. The study of literature showed the less of chemical reports and has never been reported yet.

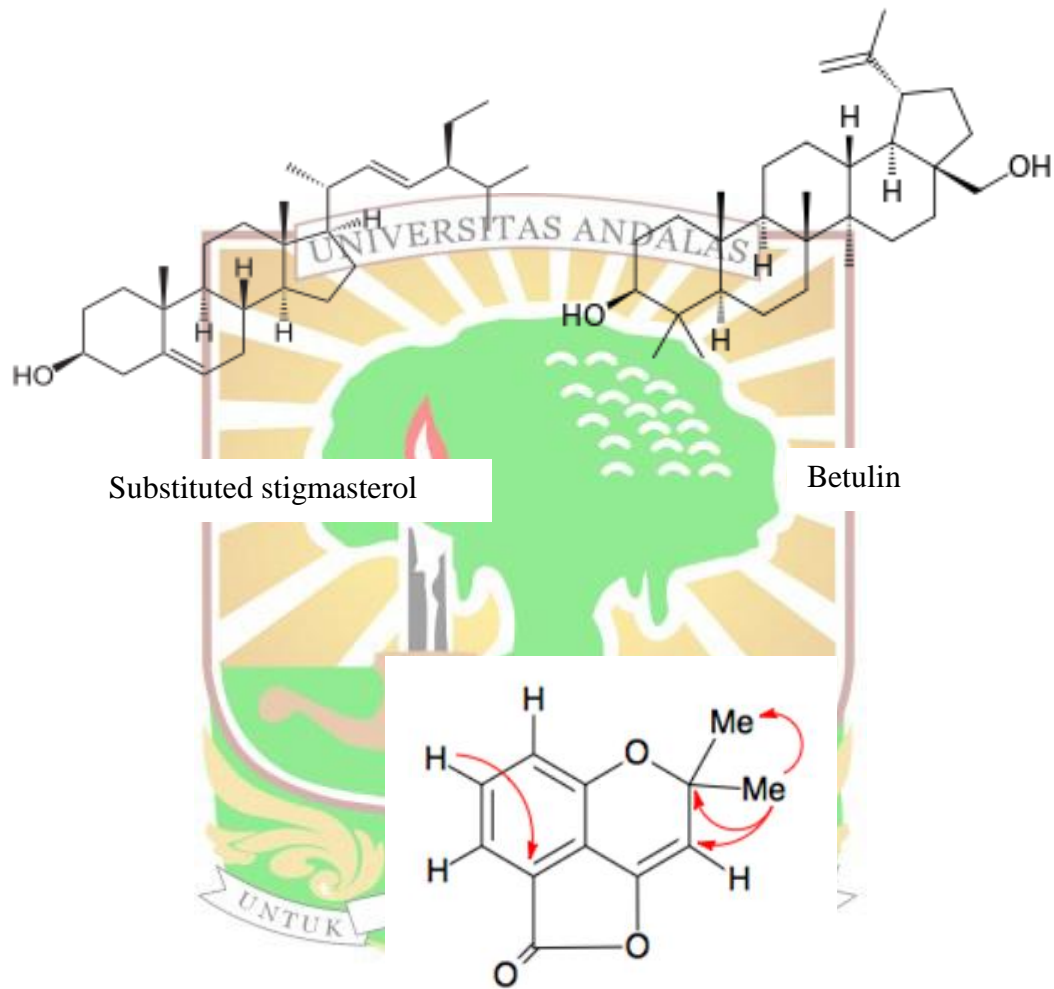
This study aimed to get information about secondary metabolites contained in *Callicarpa arborea* Roxb coming from Indonesia. Some general

methods were used in this study. The experiment was held in Natural Organic Chemistry laboratory. Extraction was conducted with maceration and partition process. Fractionation and purification were carried out with liquid vacuum chromatography (LVC), press chromatography, preparative chromatography, and washing. Purification was held with thin layer chromatography (TLC) and determination of melting point. Characterization process was performed with conventional methods (physics and chemistry) and continued with spectroscopy method.

These process yielded compound 1 as white amorphous crystal examined as substituted stigmasterol (steroid group) 70.025 mg from n-hexane fraction; compound 2 as white amorphous crystal examined as betulin (triterpenoid group) 11.560 mg from dichloromethane fraction; and compound 3 as yellow amorphous crystal examined as 2,2-dimethyl-4,5- α -lacto benzopyran (lactone group) 10.750 mg from ethyl acetate fraction. Molecular structure can be seen below.

Literature review showed that lactone, triterpenoid, and steroid groups have strong bioactivity as anticancer, antibacterial, and antifungal. Therefore, we did bioactivity assay for these compounds. Generally, the reactivity of 2,2-dimethyl-4,5-lacto benzopyran is stronger than that of substituted stigmasterol, and betulin is stronger than that of substituted stigmasterol against murine leukemia P388 cells, antibacterial, and antifungal. Reactivity of 2,2-dimethyl-4,5-lacto benzopyran compared with positive control compound (Artonin E) are relatively similar to the murine leukemia P 388 cells. Reactivity of 2,2-dimethyl-4,5-lacto benzopyran is stronger than the positive control compound (cefadroxil)

against *P. aeruginosa* and *B. subtilis* bacteria. The same thing happened to *A. Niger* and *T. Mentagropites* fungi. MTT assay method was used for anticancer and REMA method for antibacterial and antifungal test.



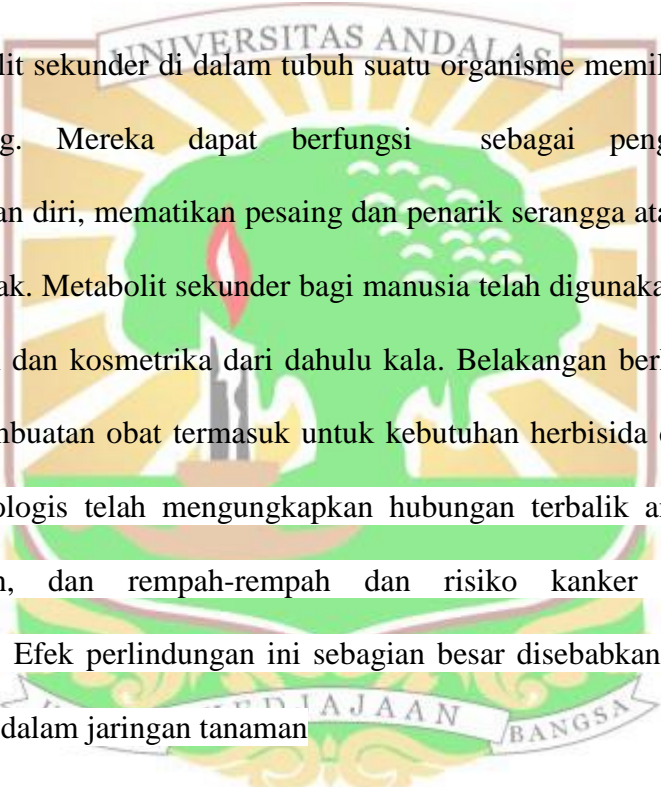
2,2-dimethyl-4,5- α - lacto benzopyran

Kajian Metabolit Sekunder dari Kulit Batang *Callicarpa Arborea* Roxb dan Uji Bioaktivitas

Oleh : M. Amin

(Pembimbing: Prof. Dr. Yunazar Manjang, Prof. Dr. Sanusi Ibrahim,
Dr. Mai Efdi dan Dr. Adlis Santoni)

RINGKASAN



Metabolit sekunder di dalam tubuh suatu organisme memiliki fungsi yang sangat penting. Mereka dapat berfungsi sebagai pengatur tumbuh, mempertahankan diri, mematikan pesaing dan penarik serangga atau hewan untuk berkembang biak. Metabolit sekunder bagi manusia telah digunakan sebagai obat-obatan, parfum dan kosmetika dari dahulu kala. Belakangan berkembang untuk pemodelan pembuatan obat termasuk untuk kebutuhan herbisida dan insektisida. Studi epidemiologis telah mengungkapkan hubungan terbalik antara konsumsi buah, sayuran, dan rempah-rempah dan risiko kanker dan penyakit kardiovaskular. Efek perlindungan ini sebagian besar disebabkan oleh metabolit sekunder hadir dalam jaringan tanaman

Callicarpa arborea Roxb, termasuk family Verbenaceae, di Bengkulu dikenal dengan nama “ketepung daun lebar” di Inggris (Physic Nut) dan nama populernya adalah Fresh Mulberry of Northern Circarears. Tanaman ini di Bengkulu digunakan sebagai pengobatan tradisional untuk penyakit hepatitis dan diabet, sedangkan di India dan Nepal digunakan untuk penyakit demam, kepala, lambubg, kulit dan penyakit gigitan kalajengking. Dari penelusuran literatur

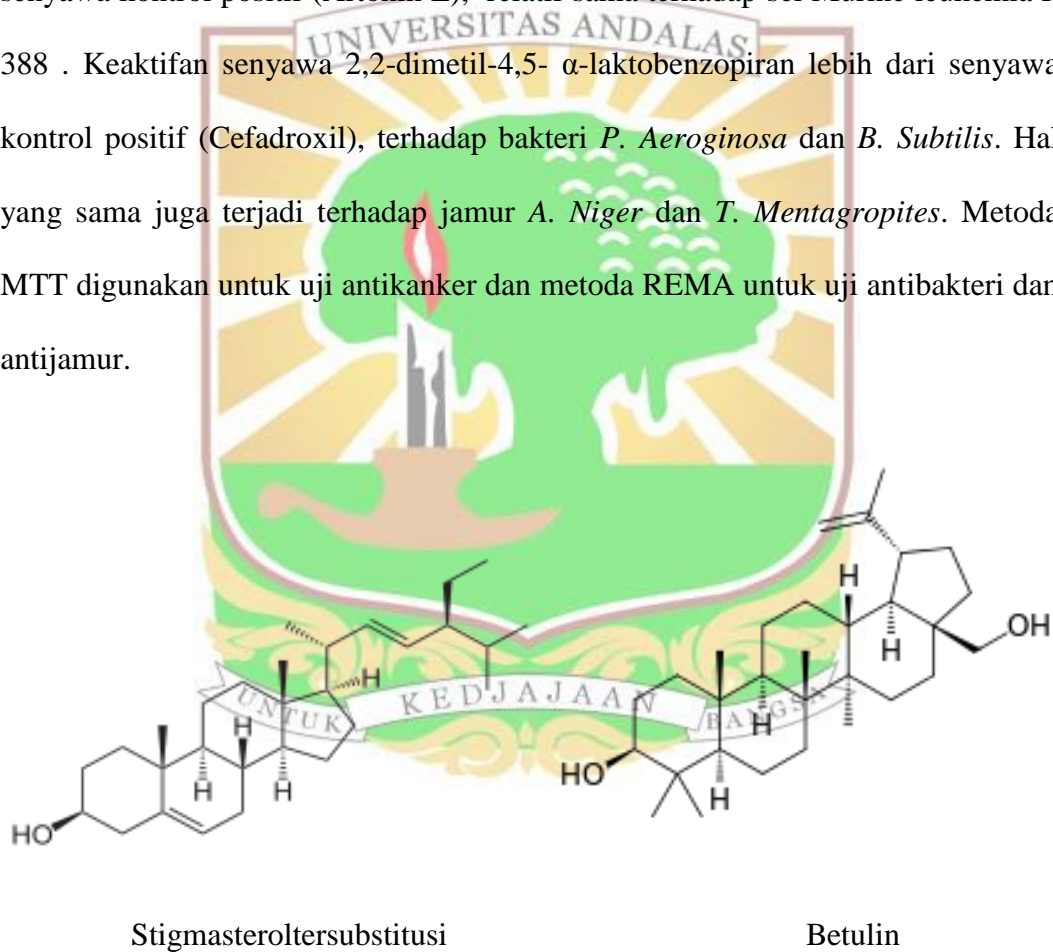
diketahui bahwa kajian kimia dari spesies ini masih relatif sedikit dan kajian kimia dari spesies ini yang berasal dari Indonesia belum pernah dilaporkan.

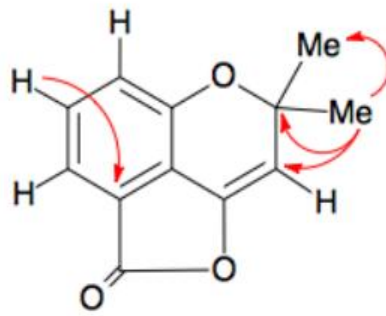
Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh informasi tentang senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam *Callicarpa arborea* Roxb yang berasal dari Indonesia. Untuk mencapai tujuan tersebut maka dilakukan penerapan berbagai metoda yang lazim digunakan pada laboratorium Kimia Organik Bahan Alam. Pada tahap ekstraksi digunakan metoda maserasi dan partisi. Pada tahap fraksinasi dan pemurnian digunakan metoda Kromatografi Vakum Cair (KVC), Kromatografi Tekan, Kromatografi Preparatif dan pencucian. Pada tahap uji kemurnian digunakan metoda Kromatografi Lapisan Tipis (KLT) dan uji titik leleh. Pada Tahap Karakterisasi digunakan metoda konvensional (fisika dan kimia) dan dilanjutkan menggunakan metoda spektroskopi.

Hasil penelitian isolasi senyawa metabolit sekunder dari kulit batang *Callicarpa arborea* Roxb didapatkan kristal-1 yaitu senyawa **Stigmasteroltersubstitusi** (golongan senyawa Steroid) sebanyak 70,025 mg berupa amorf putih dari fraksi n-heksana; kristal-2 yaitu senyawa **Betulin** (golongan senyawa Triterpenoid) sebanyak 11,560 mg berupa amorf putih dari fraksi diklorometana dan kristal-3 yaitu senyawa **2,2-dimetil-4,5- α -laktobenzopirin** (golongan senyawa Lakton) sebanyak 10,750 mg berupa amorf kuning dari fraksi etil asetat. Gambar struktur molekulnya dapat dilihat dibawah.

Selanjutnya dari literatur diketahui bahwa senyawa golongan lakton, triterpenoid dan steroid memiliki sifat bioaktifitas yang kuat sebagai antikanker,

antibakteri dan antijamur. Oleh karena itu terhadap senyawa hasil isolasi dilakukan pula uji bioaktivitas tersebut. Dari hasil uji ini menunjukkan bahwa secara umum keaktifan senyawa 2,2-dimetil-4,5-laktobenzopirin lebih aktif dari Stigmasteroltersubstitusi dan senyawa Betulin lebih aktif dari Stigmasteroltersubstitusi sebagai antikanker sel Murine leukemia P 388, antibakteri dan antijamur. Keaktifan senyawa 2,2-dimetil-4,5-laktobenzopiran dan senyawa kontrol positif (Artonin E), relatif sama terhadap sel Murine leukemia P 388 . Keaktifan senyawa 2,2-dimetil-4,5- α -laktobenzopiran lebih dari senyawa kontrol positif (Cefadroxil), terhadap bakteri *P. Aeruginosa* dan *B. Subtilis*. Hal yang sama juga terjadi terhadap jamur *A. Niger* dan *T. Mentagropites*. Metoda MTT digunakan untuk uji antikanker dan metoda REMA untuk uji antibakteri dan antijamur.





2,2-dimetil-4,5- α -laktobenzopiran



KATA PENGANTAR

Dalam kehidupan spiritual begitu terasa peran Sang Khalik terhadap perjalanan manusia ciptaanNya. Pada hari ini intervensiNya itu kembali memberikan rasa kebahagiaan pada penulis dalam hal penyelesaian penulisan Disertasi yang berjudul “Kajian Metabolit Sekunder Dari Kulit Batang *Callicarpa Arborea* Roxb Dan Uji Bioaktifitas”.

Disertasi ini merupakan syarat untuk memperoleh gelar Doktor pada program doktor Ilmu Kimia Pascasarjana Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas, Padang.

Sungguh banyak pihak yang terlibat memberikan bantuan pada Penyelesaian Disertasi ini. Oleh karena itu pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sedalamnya kepada:

1. Komisi Pembimbing:

Prof. Dr. H. Yunazar Manjang, sebagai Ketua merangkap anggota.

Prof. Dr. H. Sanusi Ibrahim, MS, sebagai Anggota.

Dr. Mai Efdi, M. Si, sebagai Anggota.

Dr. H. Adlis Santoni, sebagai Anggota

Yang telah sangat banyak memberikan arahan, bimbingan dan nasehat pada penyelesaian disertasi ini.

2. Komisi Penguji:

Emeritus Professor Sjamsul Arifin Achmad (Penguji Eksternal)

Prof. Dr. H. Hazli Nurdin

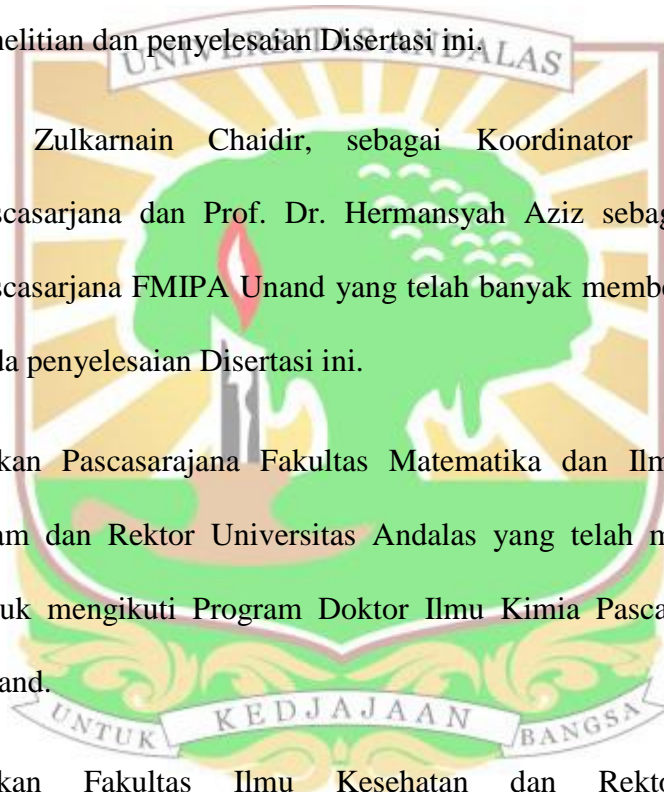
Prof. Dr. H. Syukri Arief

Yang telah sangat banyak memberikan perhatian dan masukan selama penelitian dan penyelesaian Disertasi ini.

3. Dr. Zulkarnain Chaidir, sebagai Koordinator Bidang Kimia Pascasarjana dan Prof. Dr. Hermansyah Aziz sebagai Koordinator Pascasarjana FMIPA Unand yang telah banyak memberikan dorongan pada penyelesaian Disertasi ini.

4. Dekan Pascasarjana Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam dan Rektor Universitas Andalas yang telah memberikan izin untuk mengikuti Program Doktor Ilmu Kimia Pascasarjana FMIPA Unand.

5. Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan dan Rektor Universitas Muhammadiyah Bengkulu yang telah merekomendasi kepada penulis untuk mengikuti Program Doktor Ilmu Kimia Pascasarjana FMIPA Unand.



6. Koordinator Kopertis Wilayah II, Palembang yang telah memberikan rekomendasi kepada penulis untuk mengikuti Program Doktor Ilmu Kimia Pascasarjana FMIPA Unand.
7. Menteri Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan (saat itu) yang telah memberi Surat Keputusan kepada penulis untuk tugas belajar mengikuti Program Doktor Ilmu Kimia Pascasarjana FMIPA Unand, beasiswa dan dana Hibah Doktor.
8. Kepala Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam (KOBA) dan Ketua Laboratorium Kimia Organik Sintesis (KOS) FMIPA Unand yang telah memberikan izin pemakaian fasilitas laboratorium.
9. Kepala Herbarium Universitas Andalas, Padang yang telah mengidentifikasi tanaman yang diteliti.
10. Kepala Laboratorium Biota Sumatera dan Kebun Tanaman Obat Universitas Andalas, khususnya Widya yang telah membantu perekaman Spektrum UV-Vis dan pengolahan bahan sampel.
11. Kepala LIPI Serpong, khususnya ibu Sofa Fajriah yang telah membantu perekaman spektrum NMR.
12. Kepala Laboratorium Bio Organik ITB Bandung, khususnya ibu Suzany Dwi Ellita yang telah membantu uji Bio Assay (Sel kanker leukemia P 388).



13. Kepala Laboratorium Kimia Organik FMIPA Unri, bapak M. Almurdati yang telah membantu uji Bio Assay (Antibakteri dan antijamur).

14. Kepala Laboratorium Instrumen Kimia UNP, khususnya bapak Zulkifli yang telah membantu perekaman spektrum FTIR.

15. Bapak dan Ibu dosen jurusan Kimia yang telah banyak memberikan masukan.

16. Ibu-ibu Analis di Laboratorium Jurusan Kimia FMIPA Unand.

17. Rekan Sejawat di laboratorium KOS, KOBA, LBS dan KTO Universitas Andalas, Padang yang telah banyak memberikan bantuan.

18. Kepada semua pihak yang telah berjasa memberikan bantuannya.

Mudah-mudahan Semua kebaikan Bapak, Ibu dan saudara mendapatkan balasan berlipat ganda dari Allah SWT.

Disertasi ini mudah-mudahan ada manfaatnya dan walaupun penulisannya telah dilakukan sebaiknya namun tetap saja masih banyak kekurangannya. Oleh karena itu penulis mohon kepada bapak, ibu dan kepada semua pihak untuk dapat memberikan masukan demi kesempurnaannya.

Padang, April 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
DISERTASI SEBAGAI PERSYARATAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI	iv
RIWAYAT HIDUP	v
KATA PERSEMBAHAN	vi
SUMARRY	vii
RINGKASAN	x
KATA PENGANTAR	xiv
DAFTAR ISI	xviii
DAFTAR TABEL	xxiii
DAFTAR GAMBAR	xxiv
DAFTAR LAMPIRAN	xxv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	2

	Halaman
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Hipotesis	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Keanekaragaman Tumbuhan	5
2.2 Botani dari <i>Callicarpa arborea</i> Roxb	5
2.3 Klasifikasi Tanaman <i>Callicarpa arborea</i> Roxb	6
2.4 Ethnomedical Dari Genus <i>Callicarpa</i>	7
2.5 Kandungan Kimia Tanaman genus <i>Callicarpa</i>	8
2.5.1 Terpenoid dan Steroid	8
2.5.2 Flavonoid	21
2.5.3 Fenil Propanot	22
2.6 Bioaktifitas Lakton, Betulin, Stigmasterol Sebagai Antikanker, Antibakteri dan AntiJamur	31
2.7 Metoda MTT	31
2.8 Metoda REMA	33
BAB III METODA PENELITIAN	36
3.1 Tempat dan Waktu	36
3.2 Bahan dan Alat	37
3.2.1 Bahan Kimia	37

	Halaman	
3.2.2	Bahan Mikroorganisme	37
3.3	Peralatan	38
3.4	Metoda	38
3.4.1	Penetapan Tanaman	38
3.4.1.1	Penelusuran Tanaman	38
3.4.1.2	Identifikasi Tanaman	39
3.4.2	Pengumpulan dan Pengelolaan Sampel	39
3.4.3	Ekstraksi	40
3.4.4	Fraksinasi	40
3.4.5	Skrining Fitokimia	41
3.4.6	Pemisahan, Pemurnian dan Uji Kemurnian Kristal Kristal-1	43
3.4.6.1	Pemisahan dan Pemurnian Kristal-1	43
3.4.6.2	Uji Kemurnian Kristal-1	44
3.4.6.2.1.	Uji Kemurnian Kristal-1 Metoda KLT Satu Dimensi	44
3.4.6.2.2.	Uji Kemurnian Kristal-1 Metoda KLT Dua Dimensi	45
3.4.6.2.3	Uji Kemurnian Kristal-1 Metoda Titik Leleh	46
3.4.7	Pemisahan, Pemurnian dan Uji Kemurnian Kristal-2	46
3.4.7.1	Pemisahan dan Pemurnian Kristal M2	46



	Halaman
3.4.7.2 Uji Kemurnian Kristal-2	48
3.4.8 Pemisahan, Pemurnian dan Uji Kemurnian Kristal-3	48
3.4.8.1 Pemisahan dan Pemurnian Kristal-3	48
3.4.8.2 Uji Kemurnian Kristal-3	50
3.4.9 Penentuan Struktur Senyawa	50
3.4.10 Uji Antikanker Kristal-1, Kristal-2 dan Kristal-3 Terhadap Sel Murine Leukemia P 388 dengan Metoda MTT	50
3.4.11 Uji Antibakteri Kristal-1, Kristal-2 dan Kristal-3 Dengan Metoda REMA	51
3.4.12 Uji Antijamur Kristal-1, Kristal-2 dan Kristal-3 Dengan Metoda REMA	53
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	55
4.1 Penetapan Spesimen Tanaman	55
4.2 Pengumpulan dan Pengolahan Sampel Tanaman	56
4.3 Ekstraksi	57
4.4 Fraksinasi	58
4.5 Skrining Fitokimia	58
4.6 Uji Kemurnian Kristal-1	59
4.7 Uji Kemurnian Kristal-2	61
4.8 Uji Kemurnian Kristal-3	63

		Halaman
4.9	Penentuan Struktur Kristal-1	64
4.9.1	Karakterisasi Secara Kimia dan Fisik	64
4.9.2	Karakterisasi Secara Spektroskopi	65
4.10	Penentuan Struktur Kristal-2	68
4.10.1	Karakterisasi Secara Kimia dan Fisik	68
4.10.2	Karakterisasi Secara Spektroskopi	68
4.11	Penentuan Struktur Kristal-3	71
4.11.1	Karakterisasi Secara Kimia dan Fisik	71
4.11.2	Karakterisasi Secara Spektroskopi	71
4.12	Uji Bioaktivitas Kristal-1, Kristal-2 dan Kristal-3 Terhadap Sel Kanker, Bakteri dan Jamur	73
BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN	76
5.1	Kesimpulan	76
5.2	Saran	78
DAFTAR PUSTAKA		79



DAFTAR TABEL

No		Halaman
4.1	Hasil Fraksinasi Dari Ekstrak Metanol Kulit Batang <i>Callicarpa arborea</i> Roxb (per berat kering)	58
4.2	Skrining Fitokimia Dari Fraksi Kulit Batang <i>Callicarpa arborea</i> Roxb	59
4.3	Data NMR Kristal-1 dan Referensi	67
4.4	Data NMR Kristal-2 dan Referensi	70
4.5	Data NMR Kristal-3	73
4.6	Nilai IC50 Uji Antikanker Kristal-1, Kristal-2 dan Kristal-3 Terhadap Sel Murine Leukemia P 388 Metoda MTT	73
4.7	Hasil Uji Antibakteri Kristal-1, Kristal-2, Kristal-3 Metode Resazurin Microtiter Assay (REMA)	74
4.8	Uji Antijamur Kristal-1, Kristal-2, Kristal-3 dengan Metode Resazurin Microtiter Assay (REMA)	74



DAFTAR GAMBAR

No		Halaman
2.1	Tanaman <i>Callicarpa arborea</i> Roxb	6
2.2	Reaksi Oksidasi dari MTT	32
2.3	Reaksi Oksidasi dari Resazurin Metoda REMA	34
4.4	Uji Kemurnian Kristal NADP-1 Metoda KLT 1 Dimensi, (a) eluen 1, (b) eluen 2, (c) eluen 3.	61
4.5	Uji Kemurnian Kristal NADP-2 Metoda KLT 1 Dimensi, (a) eluen 1, (b) eluen 2, (c) eluen 3.	62
4.6	Uji Kemurnian Kristal NADP-3 Metoda KLT 1 Dimensi, (a) eluen 1, (b) eluen 2, (c) eluen 3	63



DAFTAR LAMPIRAN

No

- 1 Surat Identifikasi Tanaman dari Herbarium Jurusan Biologi FMIPA Unand
- 2 Skema Isolasi, Karakterisasi dan Uji Bioaktivitas Senyawa Isolat
- 3 Grafik Aktifitas Kristal-1, Kristal-2 dan Kristal-3 Sebagai Antikanker Sel Murine Leukemia P388
- 4 Tabel Data Optikal Densiti dari Kristal-1, Kristal-2 dan Kristal-3
- 5 Gambar Uji Antibakteri Senyawa Isolat (Stigmasterol tersubstitusi, Betulin dan 2,2-Dimetil-4,5- α -lakto benzepiran).
- 6 Gambar Uji Antijamur Senyawa Isolat (Stigmasterol tersubstitusi, Betulin dan 2,2-Dimetil-4,5- α -lakto benzepiran).





I. PENDAHULUAN

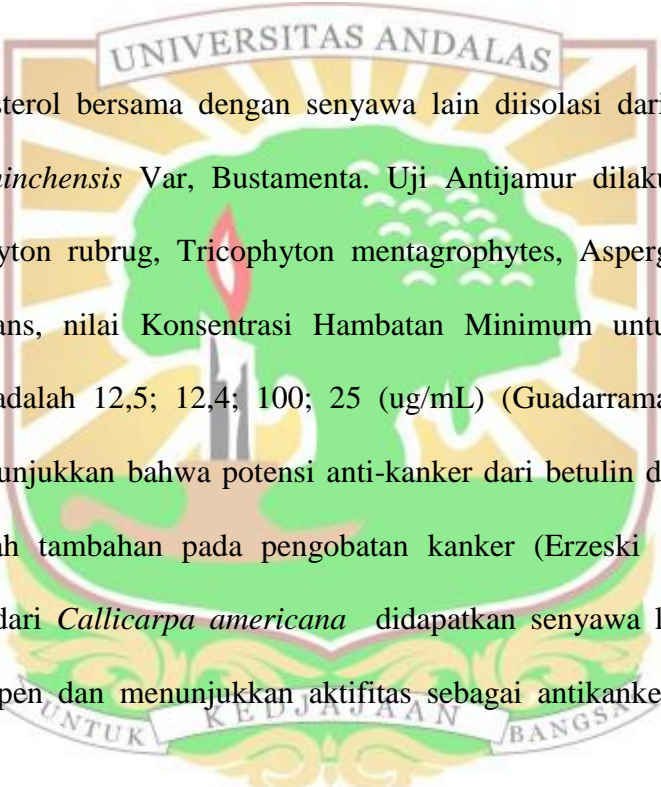
1.1. Latar Belakang

Keberadaan senyawa metabolit sekunder di alam secara kuantitatif adalah sangat sedikit atau minor dibandingkan dengan senyawa metabolit primer. Akan tetapi mereka terdiri dari aneka ragam golongan senyawa dan masing-masing dari mereka memiliki kerangka struktur yang aneka ragam pula.

Metabolit sekunder di dalam tubuh suatu organisme memiliki fungsi yang sangat penting. Mereka dapat berfungsi sebagai pengatur tumbuh, memberikan pewarnaan, mempertahankan diri dari serangan herbifora atau infeksi mikroba, penarik serangga atau hewan penyerbukan atau penyebar biji, mematikan pesaing atau kompetisi antar organisme atau antar spesies dan sebagai alat komunikasi (Mazid, et al., 2011). Metabolit sekunder bagi manusia telah digunakan sebagai obat-obatan, parfum dan kosmetika dari dahulu kala. Belakangan berkembang untuk pemodelan pembuatan obat termasuk untuk kebutuhan herbisida dan insektisida. Studi epidemiologis telah mengungkapkan hubungan terbalik antara konsumsi buah, sayuran, dan rempah-rempah dan risiko kanker dan penyakit kardiovaskular. Efek perlindungan ini sebagian besar disebabkan oleh metabolit sekunder hadir dalam jaringan tanaman (Schainer et al., 2012)

Callicarpa arborea Roxb, termasuk family Verbenaceae. Dari penelusuran literatur diketahui bahwa kajian kimia senyawa metabolit sekunder yang dilakukan terhadap tanaman tersebut adalah sebagai berikut, (Anjaneyulu, et al.,

1977) melaporkan hasil penelitian secara berkesinambungan (1962-1968) bahwa ekstraksi dari bagian daun tanaman tersebut yang berasal dari India, didapatkan senyawa asam oleonolat, lueol, β -amirin dan asam ursolat. (Jones et al., 2008) sebagai ediror melaporkan bahwa ekstrak dari daun *Callicarpa Tomentosa* (sinonim dari *Callicarpa arborea* Roxb) didapatkan senyawa verbacoside dan dari kulit batang *Callicarpa arborea* dihasilkan senyawa bauerenol, β -sitosterol dan asam batulinat.



Stigmasterol bersama dengan senyawa lain diisolasi dari bagian pucuk *Ageratina pichinchensis* Var, Bustamenta. Uji Antijamur dilakukan terhadap jamur *Tricophyton rubrug*, *Tricophyton mentagrophytes*, *Aspergillus niger* dan *Candida albicans*, nilai Konsentrasi Hambatan Minimum untuk stigmasterol berturut-turut adalah 12,5; 12,4; 100; 25 (ug/mL) (Guadarrama, 2009). Hasil penelitian menunjukkan bahwa potensi anti-kanker dari betulin dapat diterapkan sebagai langkah tambahan pada pengobatan kanker (Erzeski et al., 2009). Ekstrak buah dari *Callicarpa americana* didapatkan senyawa lakton dari tipe clerodane-diterpen dan menunjukkan aktifitas sebagai antikanker (Jones et al., 2007).

Penelitian kimia terhadap *Callicarpa arborea* Roxb yang berasal dari Indonesia belum pernah dilaporkan. Oleh karena itu penulis ingin meneliti metabolit sekunder yang terkandung dari spesies ini yang berasal dari Indonesia. Selanjutnya senyawa hasil isolasi dilakukan uji bioaktifitas terhadap sel kanker, bakteri dan jamur.

1.2. Perumusan Masalah

Perumusan masalah pada penelitian ini adalah:

- a. Bagaimana mengisolasi dan karakterisasi isolat metabolit sekunder dari kulit batang *Callicarpa arborea* Roxb.
- b. Bagaimana bioaktivitas isolat metabolit sekunder terhadap uji antikanker sel Murine Leukemia P 388.
- c. Bagaimana bioaktivitas isolat metabolit sekunder terhadap uji antibakteri.
- d. Bagaimana bioaktivitas isolat metabolit sekunder terhadap uji antijamur.

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

- a. Melakukan isolasi dan karakterisasi isolat metabolit sekunder dari kulit batang *Callicarpa arborea* Roxb.
- b. Menentukan uji bioaktivitas isolat metabolit sekunder terhadap uji antikanker sel Murine Leukemia P 388.
- c. Menentukan uji bioaktivitas isolat metabolit sekunder terhadap uji antibakteri.



- d. Menentukan uji bioaktivitas isolat metabolit sekunder terhadap uji antijamur.

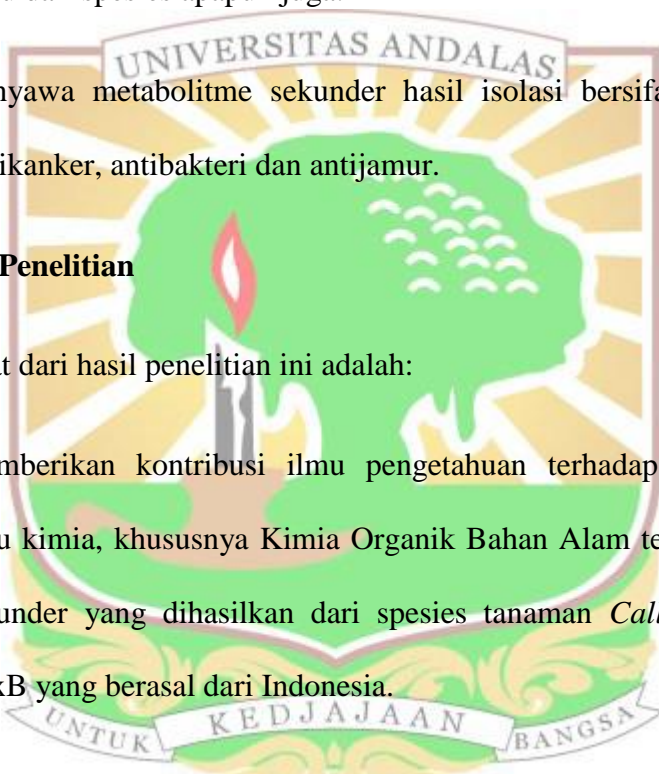
1.4. Hipotesis Penelitian

- a. Didapatkan senyawa metabolit sekunder hasil isolasi dari kulit batang *Callicarpa arborea* Roxb adalah senyawa baru dari spesies ini dan baru dari spesies apapun juga.
- b. Senyawa metabolitme sekunder hasil isolasi bersifat aktif sebagai antikanker, antibakteri dan antijamur.

1.5. Manfaat Penelitian

Manfaat dari hasil penelitian ini adalah:

- a. Memberikan kontribusi ilmu pengetahuan terhadap perkembangan ilmu kimia, khususnya Kimia Organik Bahan Alam tentang metabolit sekunder yang dihasilkan dari spesies tanaman *Callicarpa arborea* RoxB yang berasal dari Indonesia.
- b. Memberikan kontribusi ilmu pengetahuan tentang bioaktivitas metabolit sekunder yang dihasilkan sebagai antikanker, antibakteri dan antijamur.
- c. Metabolit sekunder yang dihasilkan dan yang berpotensi sebagai anti kanker, antibakteri dan antijamur dapat dijadikan pemodelan dalam pengembangan bioindustri.



II. TINJAUAN PUSTAKA

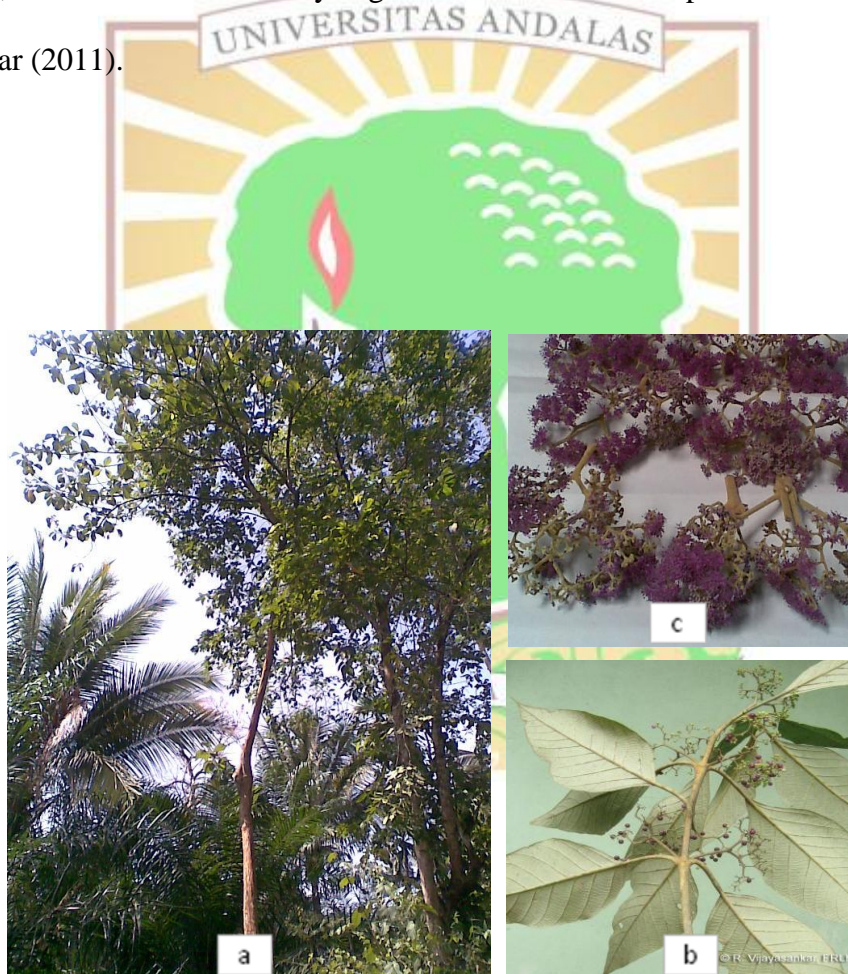
2.1. Keanekaragaman Tumbuhan

Negara Indonesia merupakan negara kedua setelah Brazil dalam hal kepemilikan keanekaragaman hayati terutama jenis tumbuhan. Keanekaragaman tumbuhan berhubungan dengan keanekaragaman senyawa kimia yang terkandung dalam tumbuhan. Kimia Bahan Alam berperan sebagai pendukung bidang bioindustri. Oleh karena itu dipandang perlu eksplorasi senyawa kimia dari tumbuhan yang dimiliki (Achmad, 2004). Kegiatan ini dapat memberikan pengaruh manfaat ganda pada pengembangan tanaman yaitu produksi, pelestarian dan agrowisata (Manjang, 2006).

2.2. Botani dari *Callicarpa arborea* Roxb

Callicarpa arborea Roxb memiliki nama sinonim *Callicarpa tomentosa* (L.) Merr adalah suatu tanaman termasuk genus Verbenaceae. Di Bengkulu dikenal dengan nama “ketepung daun lebar” di Inggris (Physic Nut) dan nama populemnya adalah Fresh Mulberry of Northern Circarears. Tanaman ini di Bengkulu digunakan sebagai pengobatan tradisional untuk penyakit kuning, sedangkan di India dan Nepal digunakan untuk penyakit demam, kepala, lambubg, kulit dan penyakit gigitan kalajengking. Namun kajian kimia dari tanaman ini masih sedikit dan dari Indonesia belum ada dilaporkan sejauh penelusuran literature yang dilakukan (Jamir, 1990) dan (Jones, 2008).

Tanaman ini merupakan cemara kecil. Daun dan bunga majemuk padat dan ditutupi dengan rambut stellata. Daun seperti kulit, panjang 15-20 cm, bulat telur sampai lonjong sempit. Bunga kecil, ungu pucat. Buah berbiji satu, diameter 2,5 mm. Waktu berbunga dan berbuah adalah pada bulan April-Juli dan bulan Agustus-Desember. Tumbuh pada ketinggian 250-2500 m di atas permukaan laut. Penyebaran tanaman ini: Himalaya, (Khumaunto Bhutan), India, Burma, China Selatan, Indo-China dan Malaya. gambar tanaman ini dapat dilihat di bawah Bokhtear (2011).



Gambar 2.1 *Callicarpa arborea* Roxb: (a) pohon, (b) daun dan buah, (c) bunga

2.3. Klasifikasi Tanaman *Callicarpa arborea* Roxb

Callicarpa arborea Roxb merupakan salah satu dari sekitar 40 spesies dari genus Verbenaceae dan klasifikasinya dapat dilihat seperti di bawah ini.

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)

Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)

Super Diferensi : Spermatophyta

Diferensi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)

Kelas : Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)

Subkelas : Asteridae

Ordo : Lamiales

Famili : Verbenaceae

Genus : *Callicarpa*

Spesies : *Callicarpa arborea* Roxb



2.4. Ethnomedical dari Genus *Callicarpa*

Genus *Callicarpa* memiliki sejarah yang kaya dari penggunaan ethnobotanical, terutama di Asia. Beberapa spesies dari genus *Callicarpa* telah mendokumentasikan penggunaan ethnobotanical sebagai tradisional dan

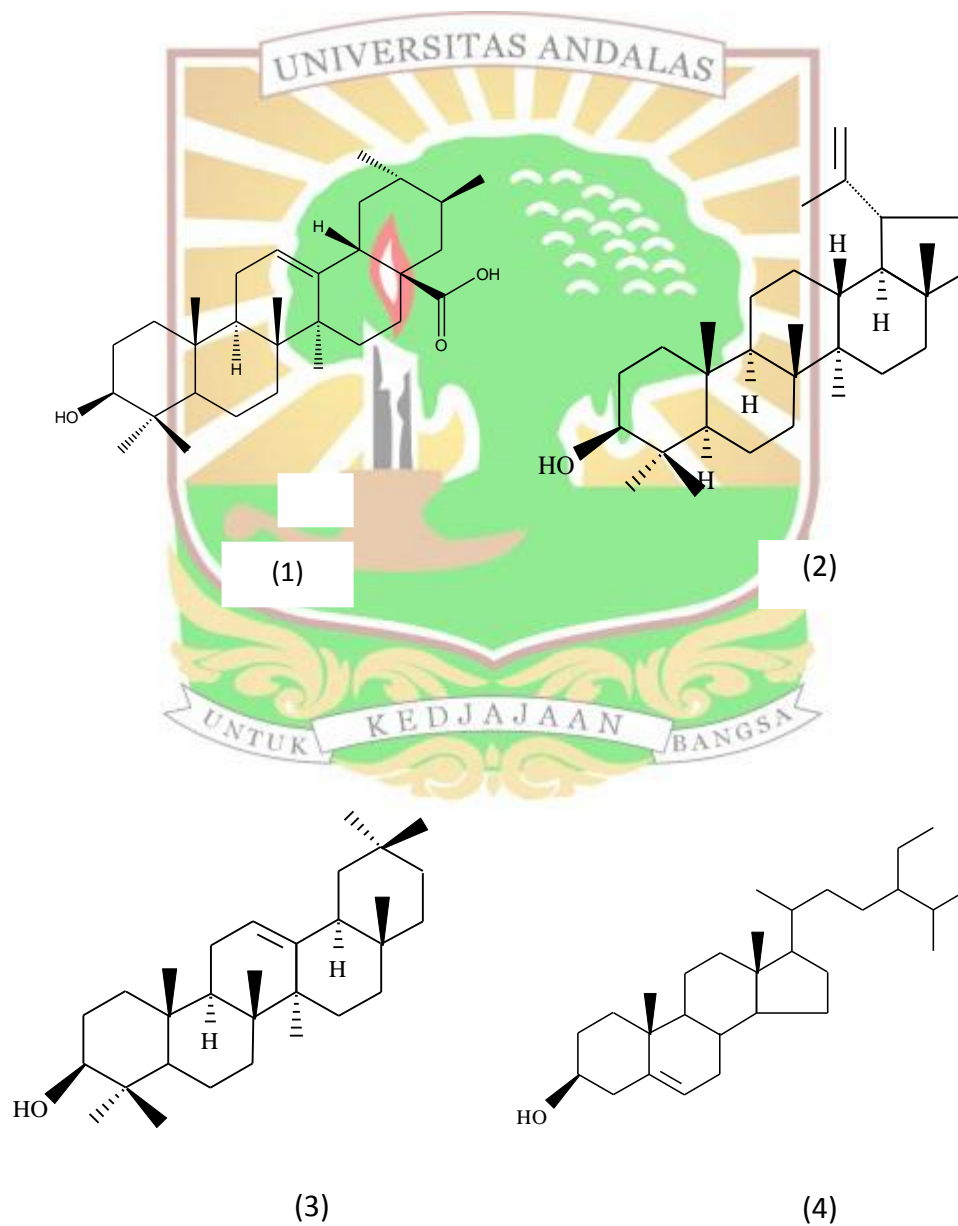
ethnomedicines dan sebagai racun ikan. Sebagai contoh, *C. arborea* Roxb. telah digunakan di India untuk mengobati penyakit kulit, dan *C. candidans* (Burm. f.) Hochr. Daunnya dilaporkan digunakan di Palau dan Filipina untuk penawet ikan. *C. formosana* Rolfe digunakan dalam obat rakyat Taiwan untuk mengobati rematik dan gangguan pada saluran pencernaan (infeksi mulut, gangguan perut dan keluhan usus). Kulit *C. lanata* L. telah digunakan di Hindia Timur sebagai pengganti daun sirih. *C. macrophylla* Vahl digunakan secara luas dalam sistem India dan Cina obat tradisional. Di India, biji *C. macrophylla* digunakan untuk mengobati infeksi oral dan "keluhan usus", ekstrak daun digunakan untuk mengobati rematik, jus buah digunakan untuk mengobati demam, dan minyak aromatik dari akar adalah digunakan untuk mengobati "perut". Dalam Pengobatan Tradisional Cina, *C. macrophylla* dan dua spesies lain (*C. pedunculata* R.Br. dan *C. cathayana* Chang) telah digunakan untuk menghentikan pendarahan internal dan eksternal dan untuk mengobati luka bakar. *C. macrophylla* digunakan juga dalam kombinasi dengan herbal lain dalam persiapan untuk mengobati diare, disentri, cacingan, dan gangguan kulit dan untuk "membersihkan darah" dan menghilangkan racun (Jones, 2008).

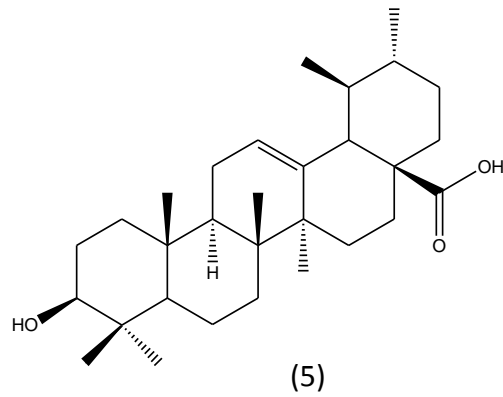
2.5. Kandungan Kimia Tanaman genus Callicarpa

2.5.1. Terpenoid dan Steroid

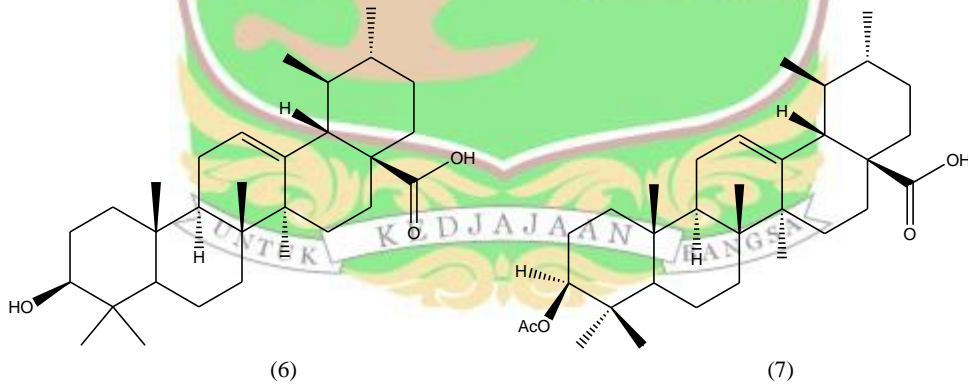
Sejauh penelusuan literature yang dilakukan tentang eksplorasi kandungan kimia terhadap genus *Callicarpa* adalah ekstraksi dari daun *Callicarpa*

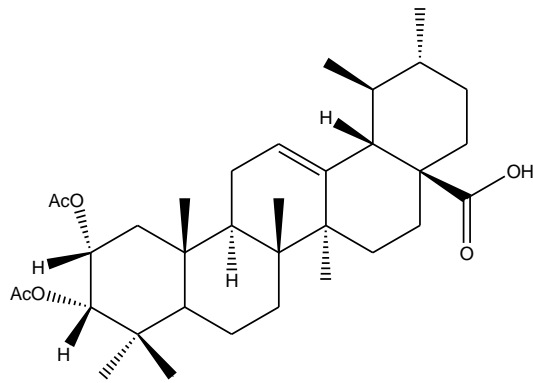
arborea Roxb yang berasal dari India dilakukan secara berkesinambungan dan dilaporkan secara berurutan: {Rao (1962) memperoleh senyawa asam oleanolat (1), Ramayu (1963) Lupeol (2), Row, Sastry (1966) β -amirin (3) dan β -sitosterol (4) dan Rao (1968) memperoleh senyawa asam ursolat (5)} dalam Anjaneyulu (1977).





Ekstraksi dari daun segar dari *Callicarpa formosana* ROLFE yang berasal dari Taiwan menghasilkan senyawa asam ursolat (5), asam asetilursolat (6), asam metilursolat (7), asam 2 α , 3 α -dihidroksiurs-12-en-28-olat (8) dan asam 2 α , 3 α -diasetoksiurs-12-en-28-olat (9) (Chen, Lai dan Wu, 1986).

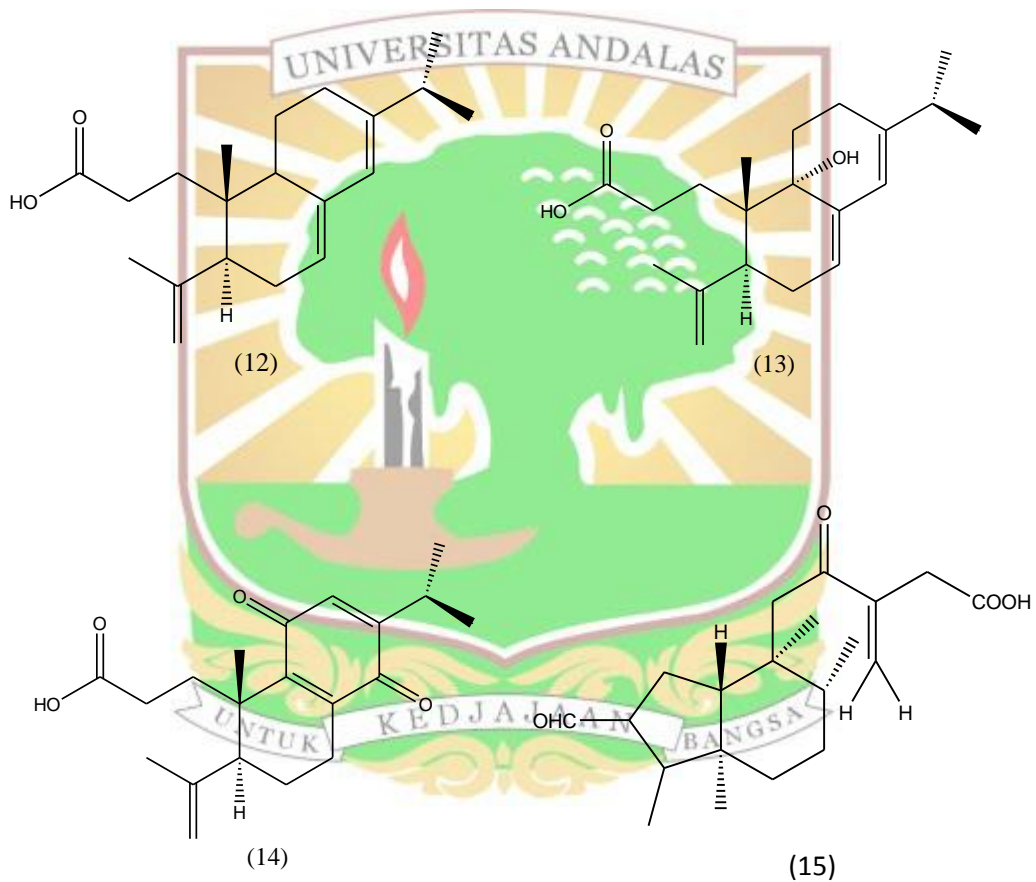
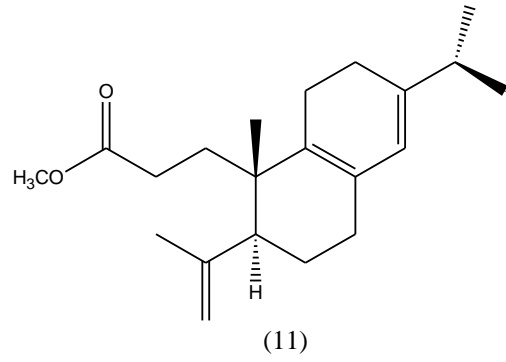
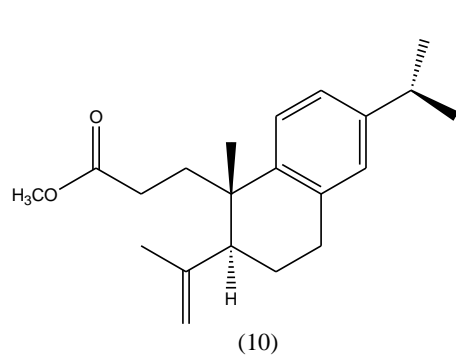




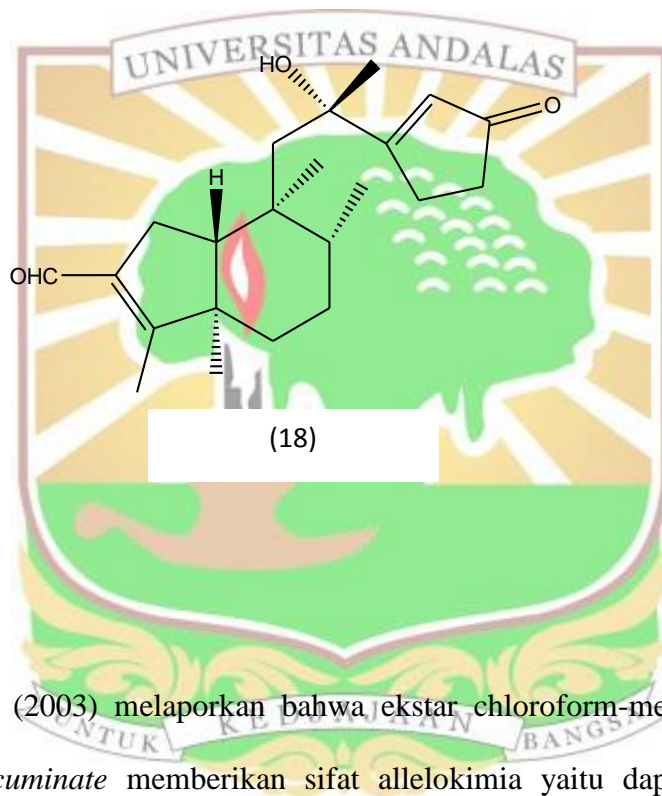
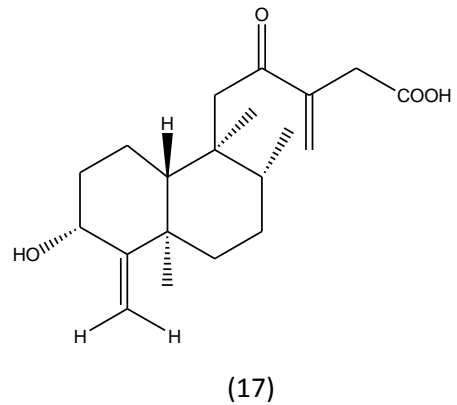
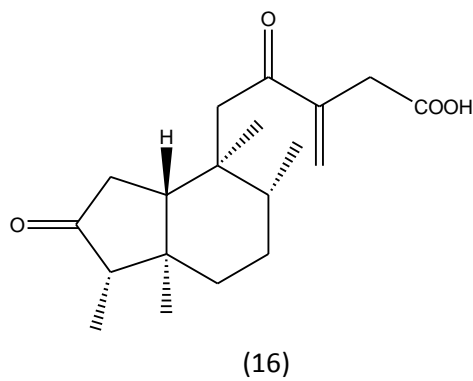
(9)

Suatu senyawa diterpen yaitu 17-isopropylideno-3-oxo-phyllocladane telah berhasil diisolasi dari daun- *Callicarpa macrophylla* yang berasal dari India (Singh dan Agpawal, 1994). Penelitian terhadap akar *Callicarpa macrophylla* Vahl yang juga berasal dari India, telah berhasil meidentifikasi senyawa monoterpen sebanyak 22,5 % (α -thujone, α -pinene, sabinene, β -pinene, α -pheladrene, p-cymene, cineole, linalool, borneol, terpine 4-ol, α -terpineol, δ -terpineol, eugenol, β -bourpenene, β -etemene dll) dan senyawa terpenoid suku tinggi sebanyak 77,5 % (sesquiterpen, hidrokarbon, caryophyllene oksida, sesquiterpen alcohol dll) (Sharma et all, 2000)

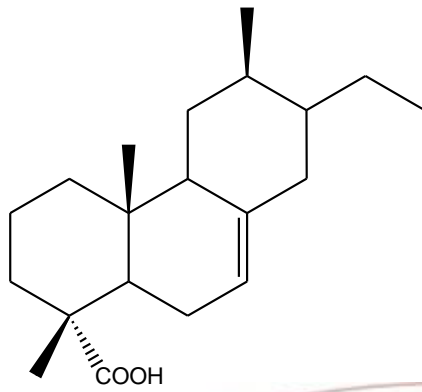
Ekstraksi dari daun dan ranting *Callicarpa pilosissima* yang berasal dari Taiwan dihasilkan senyawa 12-deoksi-seco-hinokiol metal ester (10), 12-deoksi-11,12-dihidro-seco hinokiol metal ester (11), asam callicarpat (12), asam α -hidroksi callicarpat A (13), asam callicarpat B (14) (Chen et al, 2009).



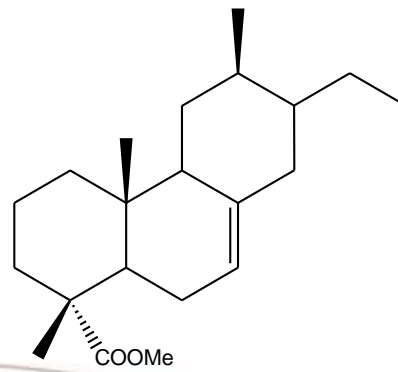
Ekstraksi dari daun *Callicarpa pentandra* yang berasal dari malasia dihsilkan empat diterpenoid yaitu asam pentandranoat A (15), asam pentandranoat B (16), asam pentandranoat C (17) dan pentandralakton (18) (Xu, 1999).



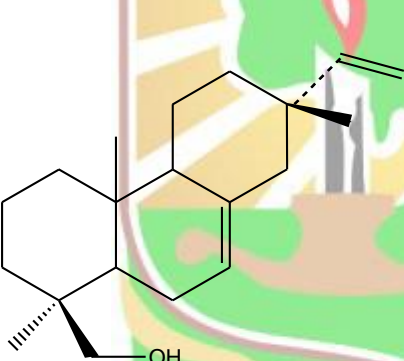
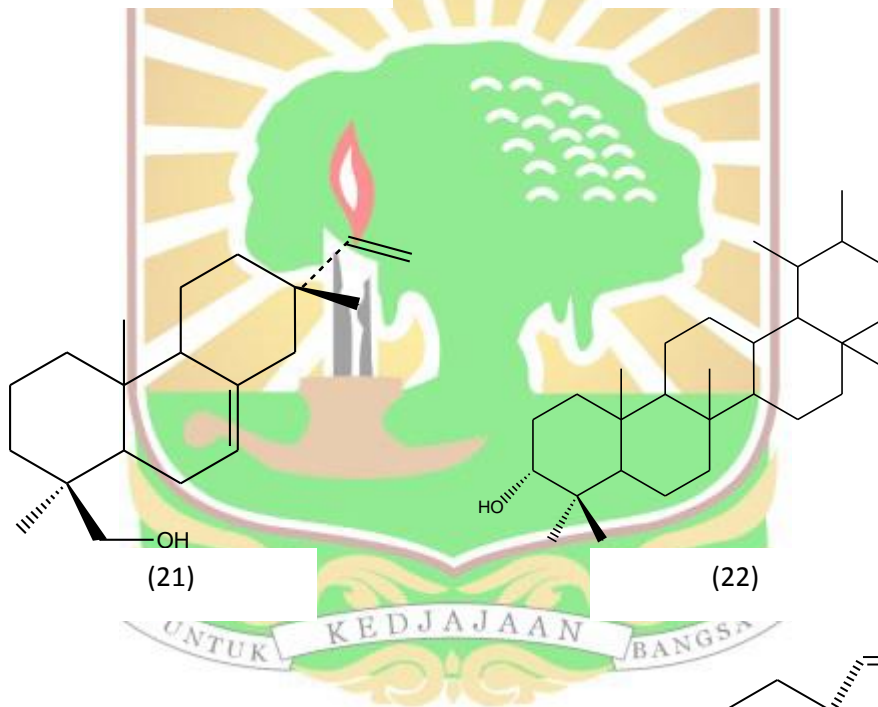
Anaya (2003) melaporkan bahwa ekstar chloroform-metanol dari daun *Callicarpa acuminata* memberikan sifat allelokimia yaitu dapat menghambat pertumbuhan akar tanaman uji sebesar 23-70 %. Selain itu juga diperoleh senyawa asam isopimarat, asam isopimarat metal ester, sandaracopimaradien-19-ol, akhdarenol, α -amirin dan salvigenin. Semua senyawa tersebut bersifat fitotoksik dan α -amirin memberikan sifat fitotoksik yang kuat. Asam isopimarat (19), Asam isopimarat metil ester (20), akhdarenol (21) dan α -amirin (22) bersifat antifidan, salvigenin (23) dan sandaracopimaradien-19-ol (24).



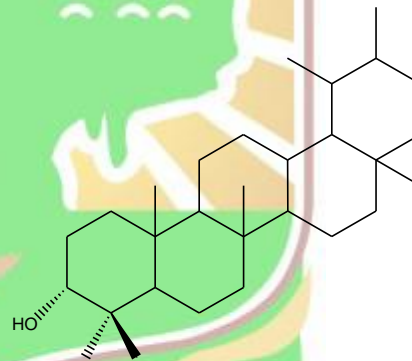
(19)



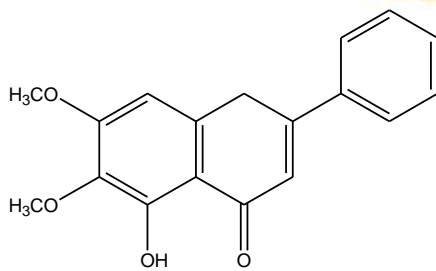
(20)



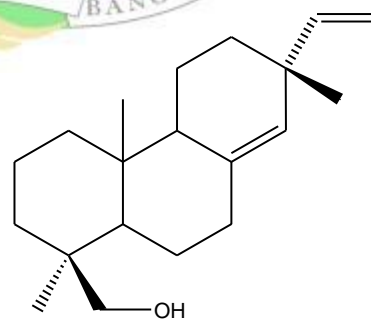
(21)



(22)

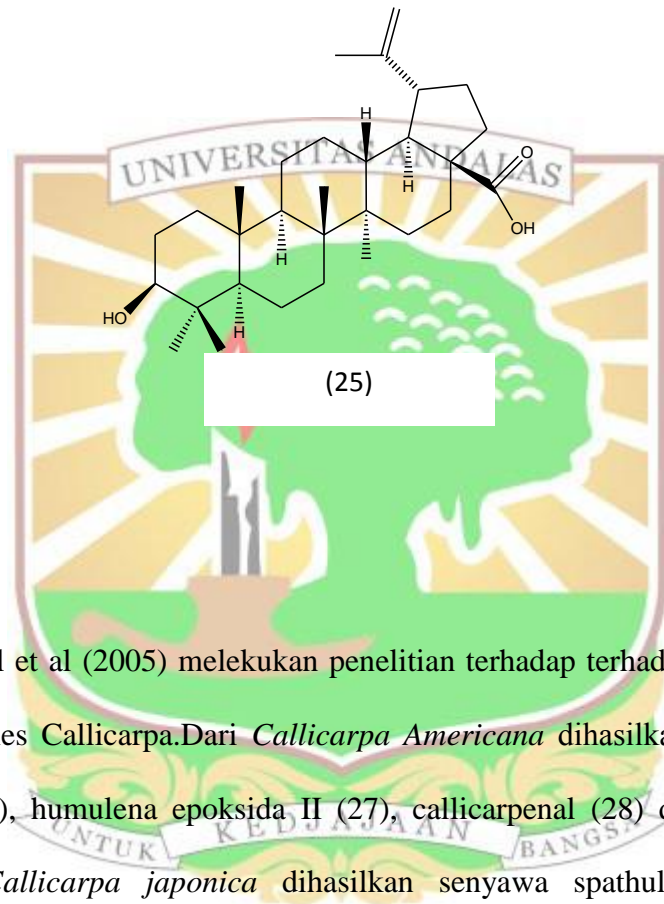


(23)

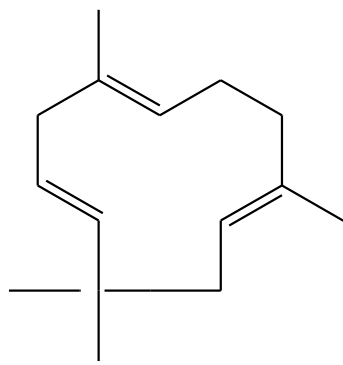


(24)

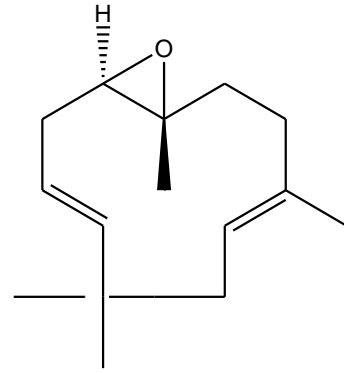
Dalam Jurnal List, Jone dan Kinghorn (2008) merilis bahwa dari bagian daun *Callicarpa tomentosa* dihasilkan verbacoside dan dari kulit batang *Callicarpa arborea* dihasilkan β -sitosterol (4) dan asam betulinat (25)



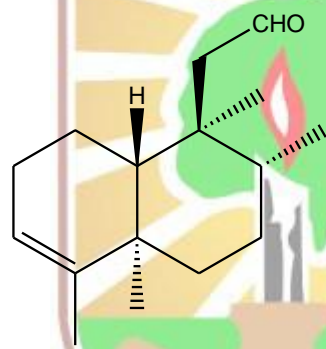
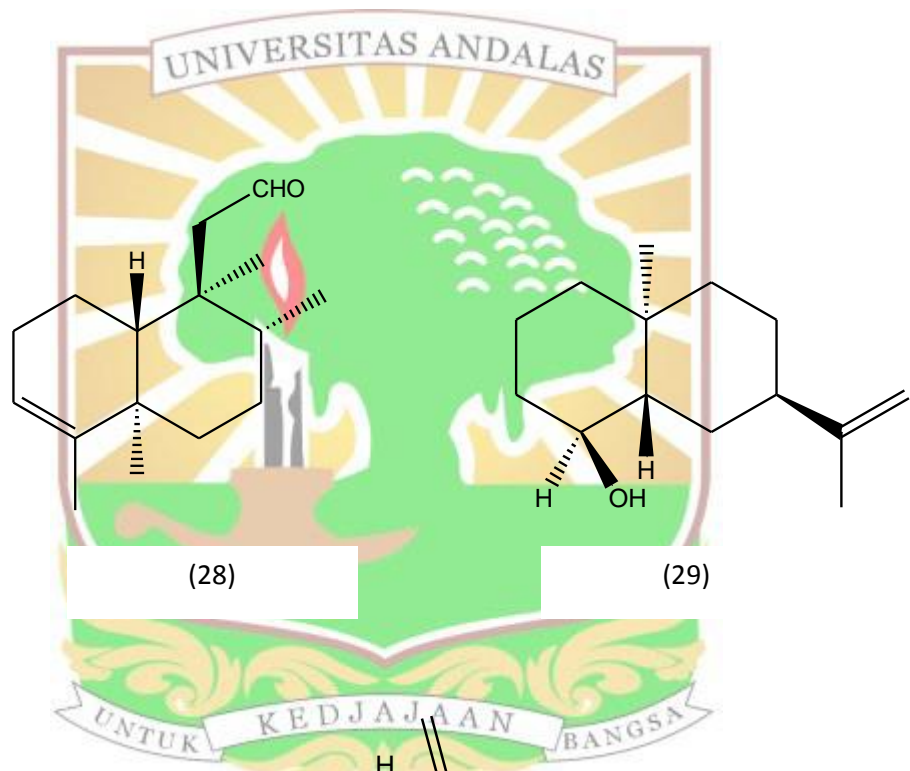
Cantrel et al (2005) melakukan penelitian terhadap ekstrak daun dari dua spesies *Callicarpa*. Dari *Callicarpa Americana* dihasilkan senyawa α -humulena (26), humulena epoksida II (27), callicarpenal (28) dan intermedeol (29). Dari *Callicarpa japonica* dihasilkan senyawa spathulenol (30). Uji bioaktivitas menunjukkan bahwa senyawa spathulenol, intermedeol dan callicarpenal bersifat sebagai penolakan terhadap nyamuk.



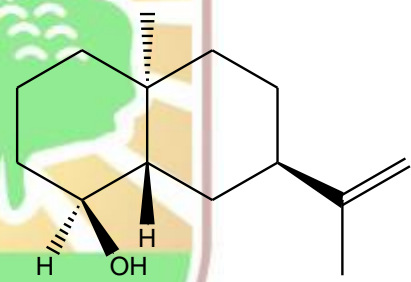
(26)



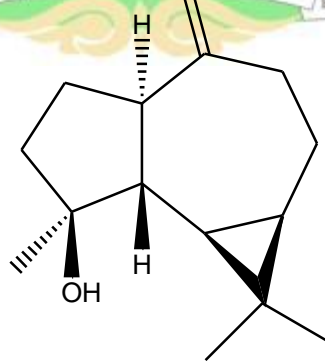
(27)



(28)

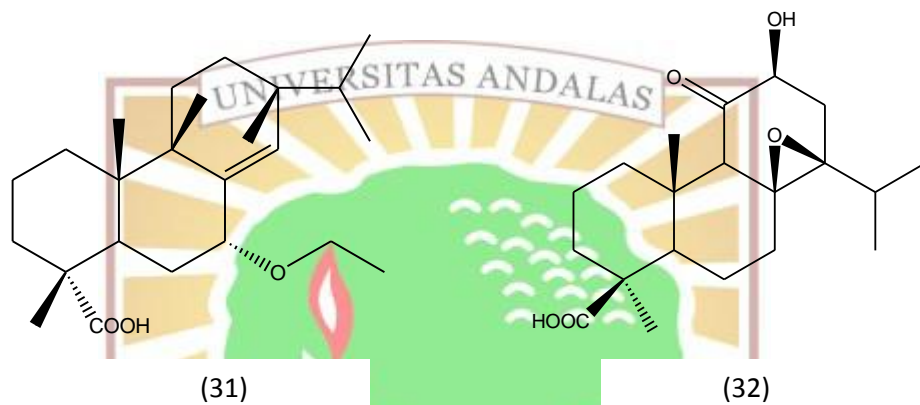


(29)

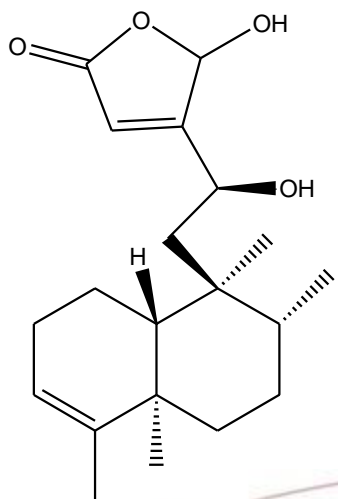


(30)

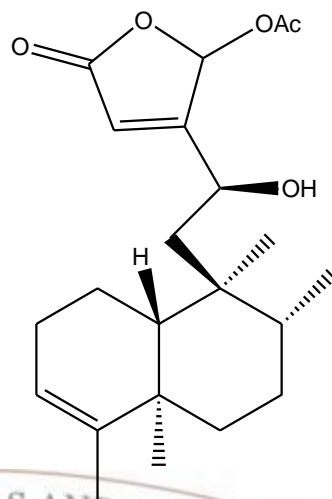
Liu (2006) pada penelitiannya terhadap ekstrak *Callicarpa pedunculata* yang berasal dari China dihasilkan senyawa asam pedunculatat A (31) dan asam pedunculatat B (32).



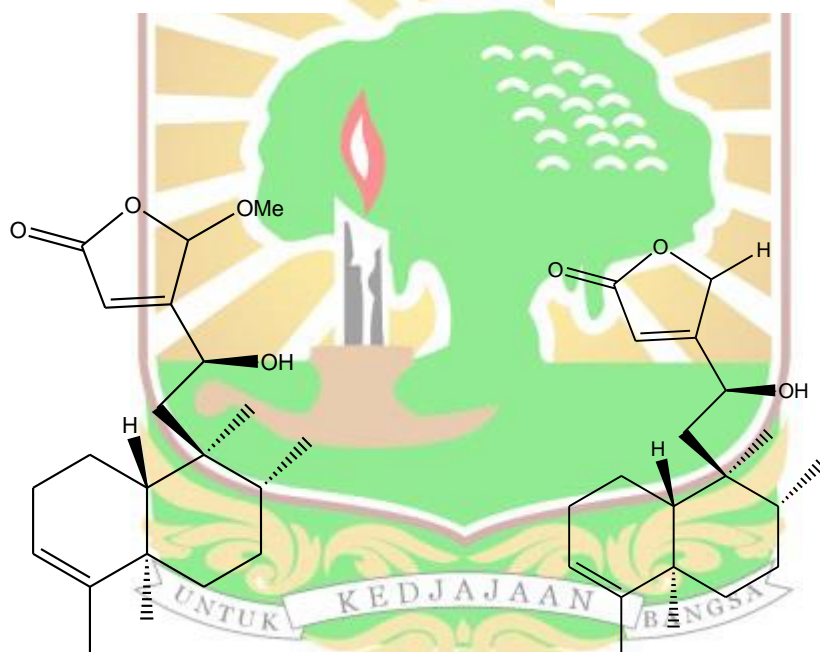
Jone et al (2007) melaporkan hasil penelitiannya bahwa ekstraksi dari buah, daun dan ranting *Callicarpa americana* yang berasal Amerika dihasilkan enam senyawa clerodane diterpen dan bersifat sitotoksik yaitu : clerodane I (33), clerodane Ia (34), clerodane II (35), clerodane III (36), clerodane IV (37), clerodane V (38) dan clerodane VI (39).



(33)

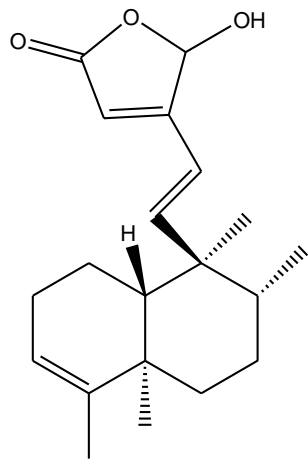


(34)

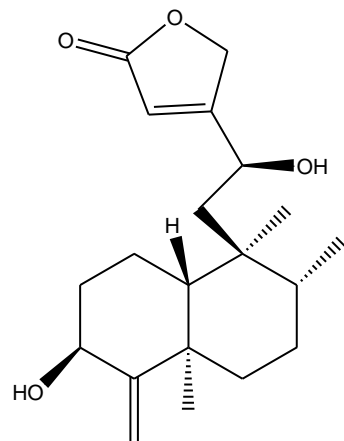


(35)

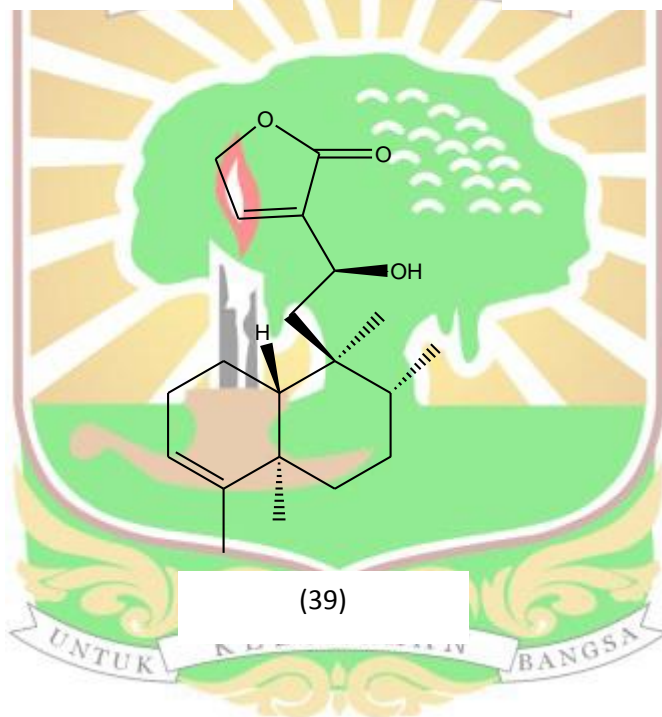
(36)



(37)



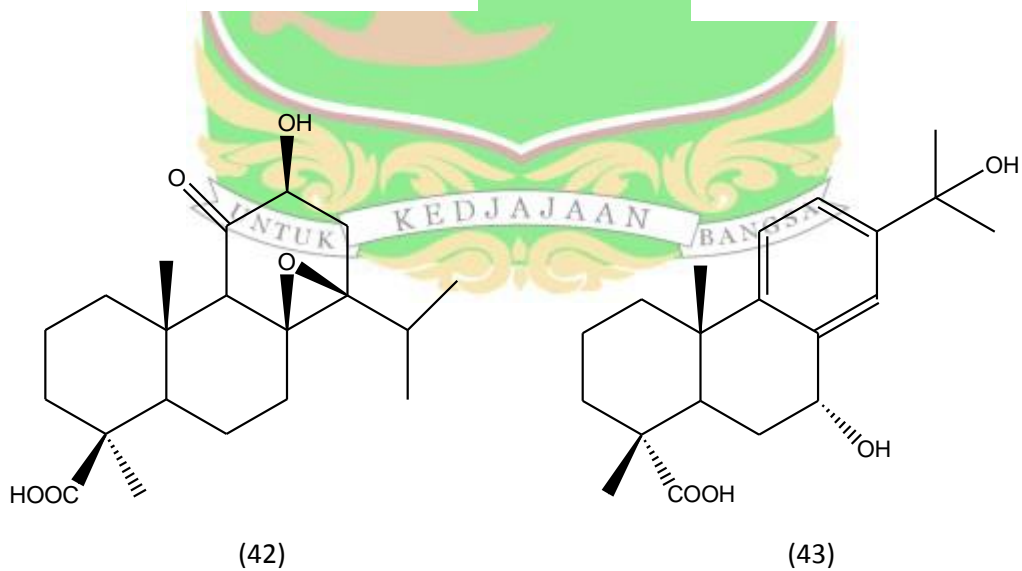
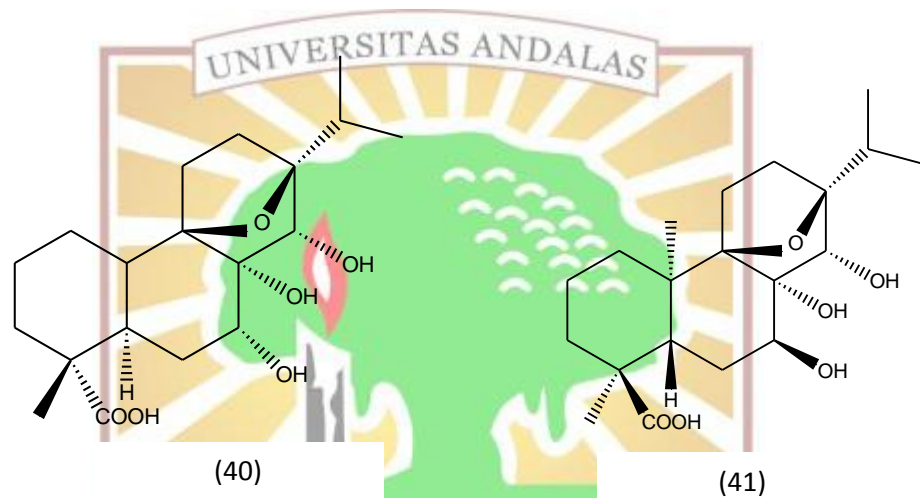
(38)



(39)

Lu dan Hua (2011) dari penelitiannya terhadap ekstrak *Callicarpa pedunculata* yang berasal dari china dihasilkan lima senyawa abietane diterpen yaitu asam dehidroabietat, asam 7-hidroksidehidroabietat, asam 7-hidroksidehidroabietat, asam 7-oksodehidroabietat dan asam 6,8,11,13-abietatrien-18-ol.

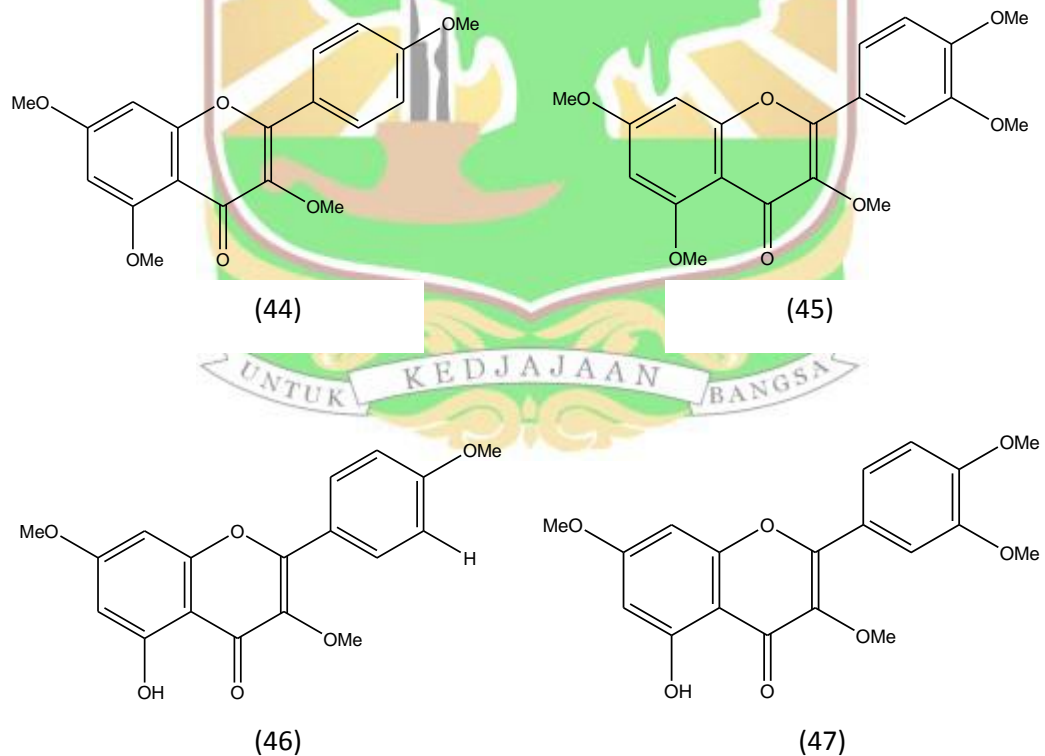
Lin et al (2012) melaporkan bahwa ekstrak dari daun *Callicarpa kochiana* yang berasal dari China dihasilkan empat senyawa abietane diterpen yaitu asam kochianat A (40), asam kochianat B (41), asam pedunculat B (42) dan asam 7a,15-dihidroksidehidroabietat (43).

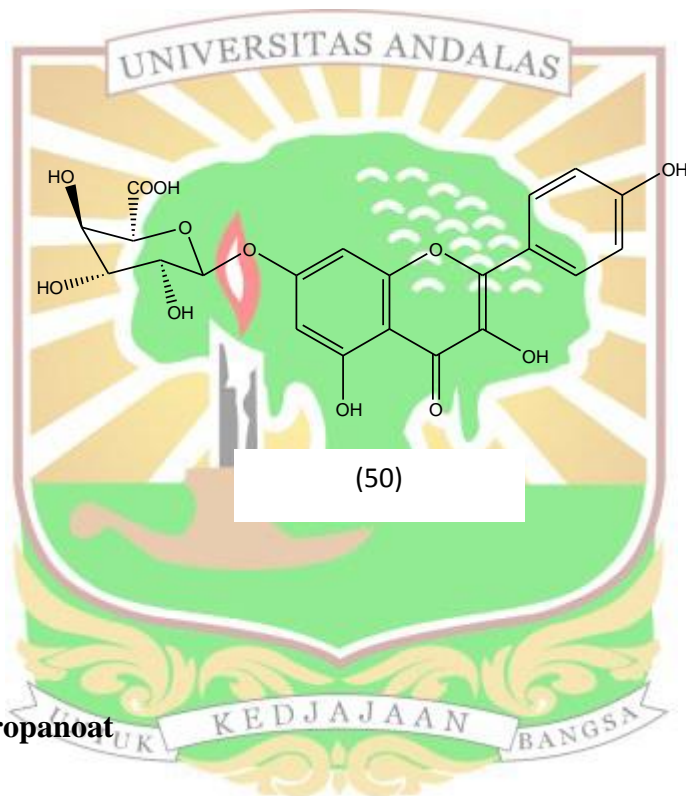
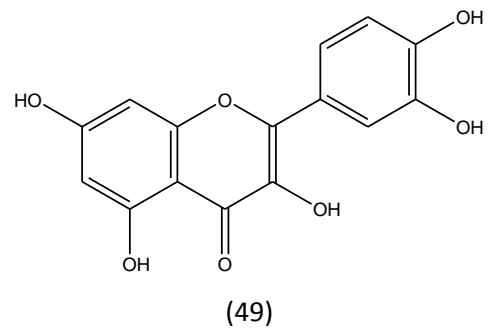
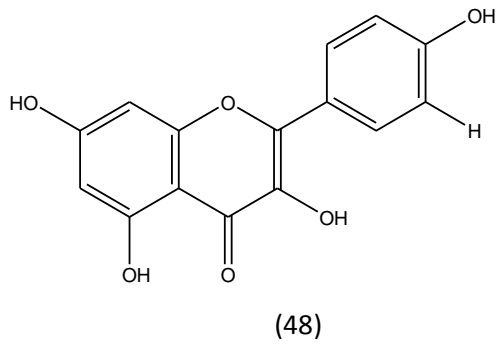


2.5.2. Flavonoid

Isolasi kimia dari daun *Callicarpa formosana* Rolfe yang berasal dari Taiwan dihasilkan senyawa 3,4',5,7-tetrametoksiflavon (44), 3,3,4,5,7-pentametoksiflavon (45), 5-hidroksi,3,4',7-trimetoksiflavon (46), 5-hidroksi-3,3,4',7-tetrametoksiflavon (47), kaempferol (48), asam 2 α ,3 α -dihidroksiurs-12-en-28-oiat (49) (Chen, Lai dan Wu, 1986).

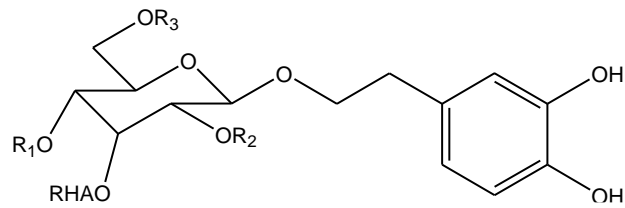
Yamasaki et al (2007) melaporkan bahwa dari hasil penelitian terhadap buah dari *Callicarpa japonica* Thumb diperoleh epigenin 7-galakturonida (50) yaitu suatu senyawa flavon yang berikatan dengan glikosida.





2.5.3. Fenil Propanoat

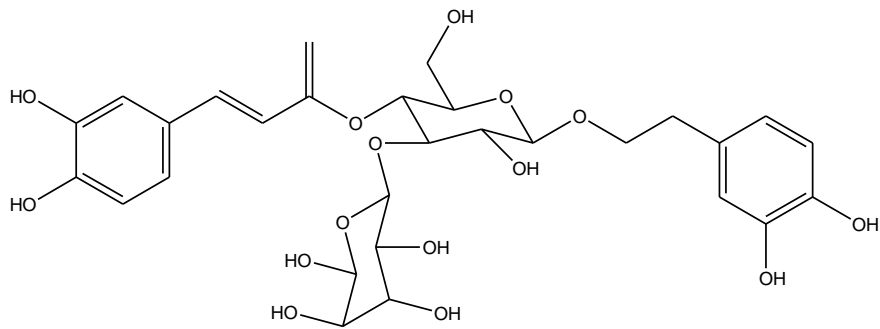
Koo et al (2005) dari hasil penelitiannya melaporkan bahwa isolasi dari bagian daun *Callicarpa dichotoma* menghasilkan menghasilkan fenil etanoat yang mengikat gugus gula. Mereka adah forithosida B (22), acteosida (23), 2'-asetilacteosida (24), poliumosida (25), brandiosida (26), echinacosida (27), isoacteosida (28), cistanosida H (29), e-tubulosida E, (30) dan z-tubulosida (31).



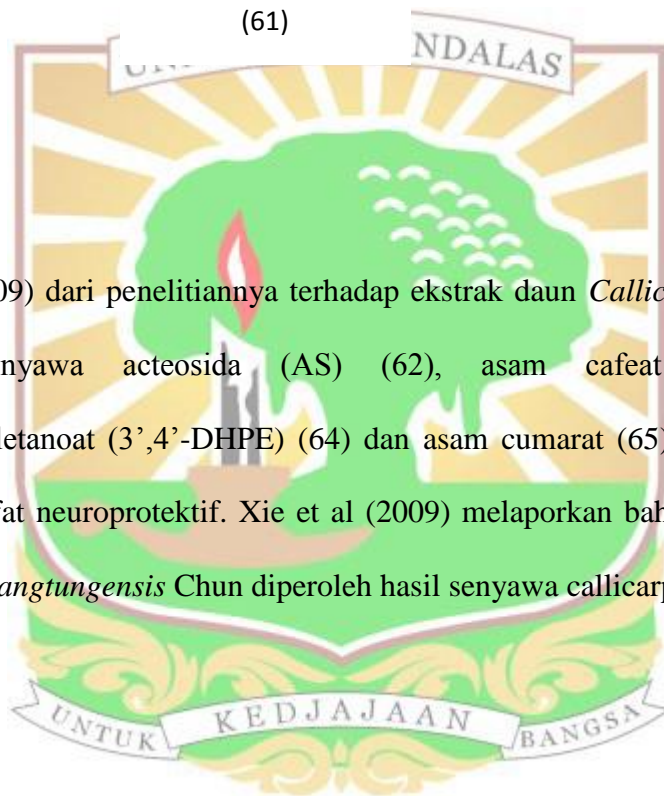
Senyawa	R1	R2	R3
(51)	caf	H	Api
(52)	caf	H	H
(53)	caf	Ac	H
(54)	caf	H	Rha
(55)	caf	Ac	Rha
(56)	caf	H	Glc
(57)	H	caf	H
(58)	H	Ac	H
(59)	E-Cm	Ac	H
(60)	Z-Cm	Ac	H

Gambar Struktur kimia dari feniletanoat glikosida senyawa (51) – (60)

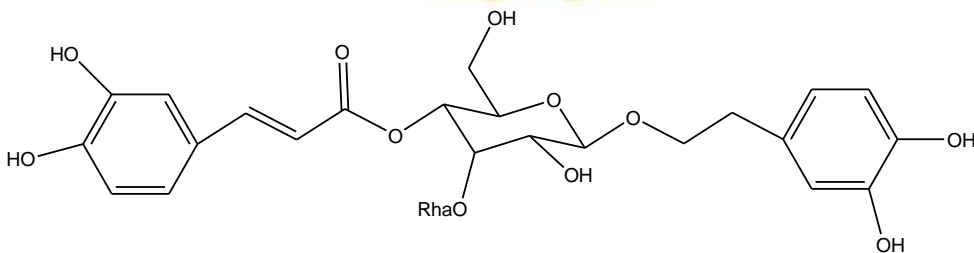
Lee et al (2006) melakukan penelitian terhadap ekstrak dari daun dan ranting *Callicarpa dichotoma* yang berasal dari Korea memperoleh hasil senyawa acteosida (61).



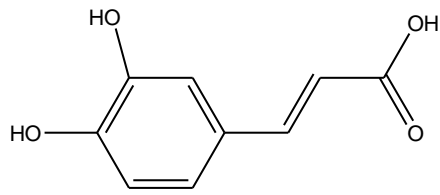
(61)



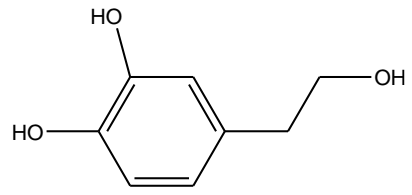
Koo et al (2009) dari penelitiannya terhadap ekstrak daun *Callicarpa dichotoma* diperoleh senyawa acteosida (AS) (62), asam cafeat (63), 3',4'-dihidroksifeniletanoat (3',4'-DHPE) (64) dan asam cumarat (65). Tiga senyawa pertama bersifat neuroprotektif. Xie et al (2009) melaporkan bahwa ekstrak dari *Callicarpa kwangtungensis* Chun diperoleh hasil senyawa callicarposide



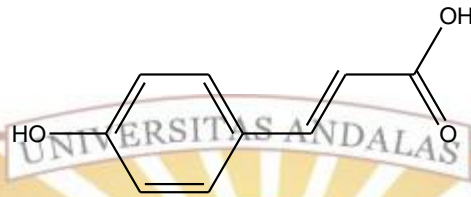
(62)



(63)



(64)



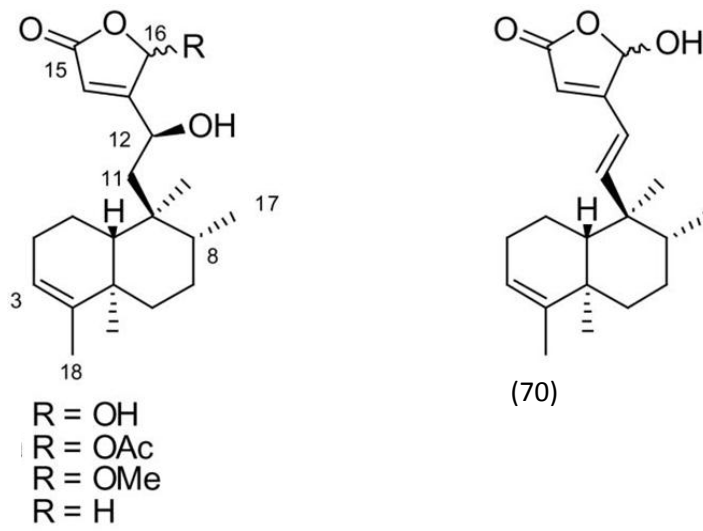
(65)

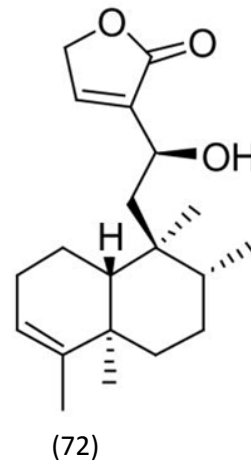
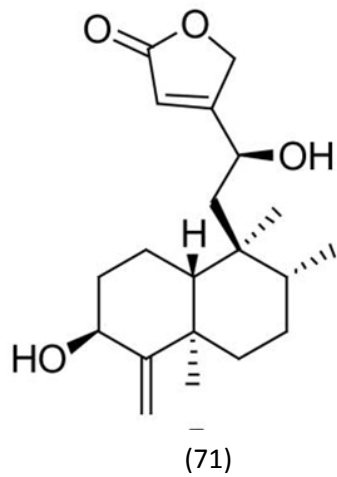
2.6. Bioaktivitas Senyawa Lakton, Betulin dan Stigmasterol Terhadap Sel Kanker, Bakteri dan Jamur

Isolat lakton berupa diterpe-clerodane sebanyak 6 senyawa (66-72) berhasil diisolasi dari buah *Callicarpa americana*. Mereka menunjukkan keaktifan sebagai antikanker setelah diuji dengan sederet sel kanker manusia dengan nilai ED_{50} (1- 4 $\mu\text{g/mL}$) (Jones et al., 2007). Induksi apoptosis pada sel tumor merupakan mekanisme penting untuk efisiensi obat kemoterapi. Telah dilaporkan bahwa beberapa jenis senyawa seskuiterpen diinduksi apoptosis pada sel kanker (Furuya et al, 1994; Woynarowski et al, 1997) dan costunolide (73) suatu lakton juga terbukti memiliki efek pencegahan pada karsinogenesis usus, (. Mori et al, 1994) menunjukkan aktivitas apoptosis-inducing dari costunolide. Studi

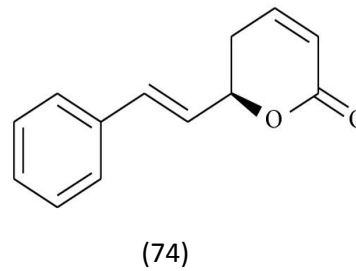
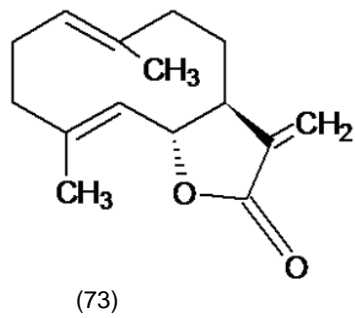
Menunjukkan bahwa costunolide menginduksi apoptosis di HL-60 sel leukemia manusia, dalam (Rasul et al., 2012)

Lakton seskuiterpen adalah kelompok besar senyawa alami, ditemukan terutama pada tanaman dari keluarga Asteraceae, dengan lebih dari 5000 struktur dilaporkan sampai saat ini. Dalam keluarga ini, genus *Artemisia* sangat baik diwakili, memiliki sekitar 500 spesies yang ditandai oleh adanya eudesmanolide dan guaianolides, terutama yang sangat oksigenik dan jarang dari germacranolide. Lakton seskuiterpen menunjukkan berbagai aktivitas biologis, seperti antitumor, anti-inflamasi, analgesik, antiulcer, antibakteri, antijamur, antivirus, antiparasit, dan jera serangga. Banyak kegiatan biologis dikaitkan dengan kelompok α -metilen- γ -lakton (Ivanescu, 2015).





Styryl-lakton GTN (74) pertama kali diisolasi pada tahun 1972. Sejak itu menjadi sasaran ekstraksi, isolasi, dan karakterisasi. Dalam kebanyakan kasus, ekstrak dibuat dengan metode ekstraksi panas dan dingin, yaitu, teknik Soxhlet dan perkolasi. GTN, suatu styryl-lakton yang sederhana memiliki potensi yang signifikan dalam pengembangan obat kanker seperti yang telah dilaporkan memiliki berbagai aktivitas biologis termasuk sebagai antikanker, anti-inflamasi, immunosupresif dan efek apoptosis. GTN telah mampu menginduksi sitotoksitas dalam berbagai jalur sel kanker termasuk sel-sel pembuluh darah otot polos (VSMC), hamster sel ovarium Cina, sel-sel ginjal, hepatoblastoma, lambung, sel ginjal, karsinoma payudara, leukemia, sel Jurkat, karsinoma hepatoseluler, sel-sel kanker paru-paru, sel-sel kanker mulut dan sel-sel HeLa tapi hemat terhadap sel-sel normal termasuk sel darah, dalam (Seyed et al., 2014).

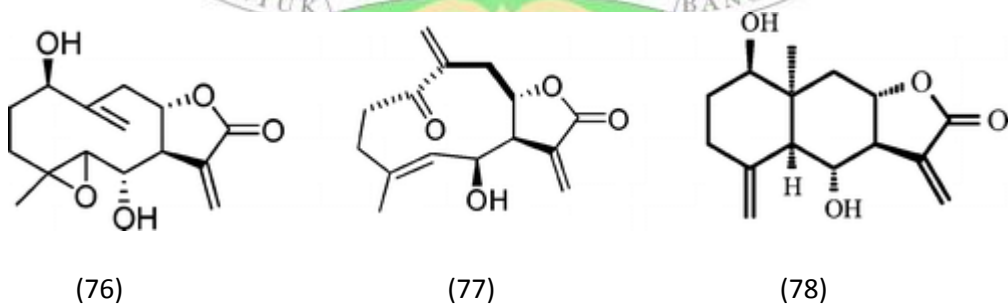


Satu Novel lakton alkena (4-hidroksi-5-metil-3-undecycliden dihydrofuran-2 (3H) diisolasi *Persea americana*. Senyawa tersebut pada konsentrasi 10 ug / mL, menunjukkan penurunan yang signifikan dari proliferasi MCF-7, sementara MCF-12 A sel secara signifikan dirangsang oleh 10 ug / mL. IC50 nilai MCF-7 sel adalah 20,48 ug / mL. konsentrasi yang lebih rendah tidak berpengaruh signifikan di kedua MCF-7 atau MCF-12A. Tingkat apoptosis sel MCF-7 yang meningkat secara signifikan. Pada konsentrasi akhir 10 mg / mL, hingga 80% dari semua sel kanker payudara sudah mati. Pada sel non-tumorigenic MCF-12A, konsentrasi yang sama (1 dan 10 mg / mL) dari senyawa tersebut menyebabkan nilai apoptosis meningkat signifikan. (Falodum et al., 2013).

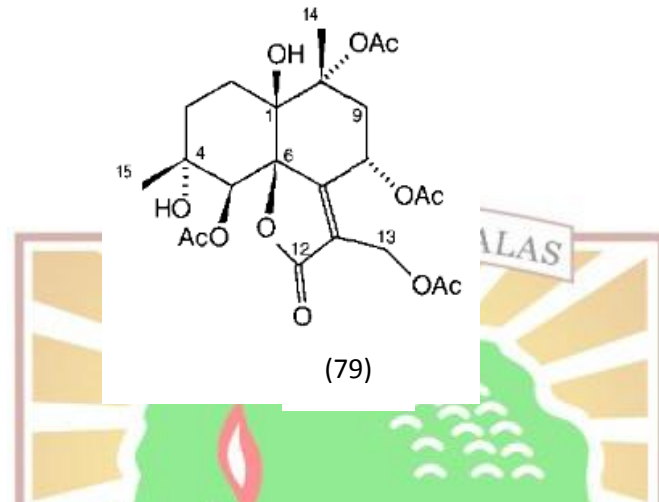
Ekstrak difraksinasi dengan kromatografi kolom, menghasilkan delapan senyawa utama berikut: 6 α -7-dehidro-N-formylnornantenine; formylnornantenine; 7,9-dimethoxytariacuripyron; 9- methoxytariacuripyron; aristololactam I; β -sitosterol; stigmasterol dan 3-hidroksi- α -terpineol . Studi ini menunjukkan bahwa Ekstrak diklorometana (rimbang) dari *A. brevipes* memiliki yang kuat in vitro

aktifitas antimikobakterial terhadap *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Minimum Penghambatan nilai Konsentrasi [MIC], 12,5 mg / mL). Senyawa yang paling aktif terhadap semua strain mikobakteri diuji adalah aristolactam I, dengan nilai MIC mulai antara 12,5 dan 25 ug / mL (Garcia et al., 2011).

Sembilan Seskuiterpen Lakton, Anthemine A (75); 1 α -Hydroxydeacetylirinol-4 α , 5 β -Epoksida; Anthemine C (76); Tatrudin A; 1-Epi-Tatrudin B; Anthemine B (77); 6-Deacetyl-B-Cyclopyrethrosin; Elegalactone A dan 1 β , 4 α , 6 α -Trihydroxyeudesm-11-En-8 α -12-Olide, diisolasi dari bagian aerial *A. Melanolepis*, selain delapan flavonoid dikenal dan Tiga Asam fenolat. Tiga senyawa di bawah adalah produk alami baru. Potensi antimikroba in vitro dari lakton seskuiterpen terisolasi terhadap empat bakteri Gram-positif dan lima Gram-negatif dan satu jamur dievaluasi menggunakan metode mikrodilusi, aktivitas sitotoksik mereka sangat prospek terhadap panel sel tumor manusia. Selain itu, profil farmakokinetik dari lakton seskuiterpen diselidiki menggunakan metode komputasi (Saroglou, 2010).



Sebuah lakton seskuiterpen (79) diperoleh dari ekstrak kloroform *Pseudelephantopus spicatus* Rohr. Strukturnya dijelaskan oleh 1 D dan spektroskopi 2D NMR. Hasil uji bioaktivitasnya menunjukkan sebagai antijamur terhadap *C. albicans* dan *A. Niger* (Ragasa et al., 1999).



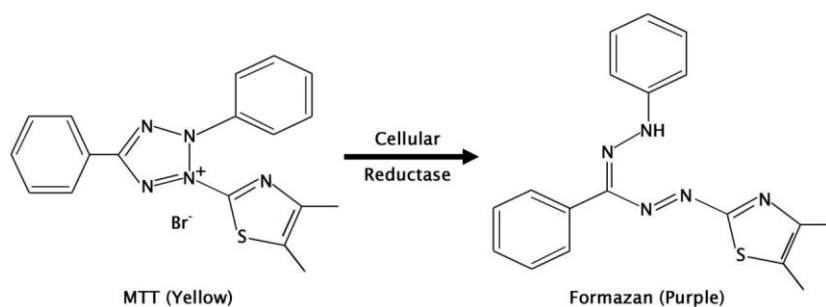
Betulin adalah triterpen pentasiklik ditemukan dalam banyak jenis tanaman, antara lain, di kulit kayu birch putih. Uji aktivitas antikanker dari betulin dilakukan dalam berbagai sel tumor manusia (neuroblastoma, rhabdomyosarcoma-medulloblastoma, glioma, tiroid, payudara, paru-paru dan kanker usus besar, leukemia dan multiple myeloma), dan di primer budaya tumor yang diisolasi dari pasien (karsinoma ovarium, karsinoma serviks dan glioblastoma multiforme). Hasil uji menunjukkan efek anti-proliferasi yang luar biasa betulin di semua kultur sel tumor diuji. Neuroblastoma (SK-N-AS) dan karsinoma kolon (HT-29) adalah yang paling sensitif terhadap efek anti-proliferasi betulin. Selanjutnya, betulin diubah sel tumor morfologi, penurunan motilitas dan induksi apoptosis. Temuan ini menunjukkan potensi anti-kanker

betulin dan menunjukkan bahwa mereka dapat diterapkan sebagai langkah tambahan pada pengobatan kanker (Erzeski et al., 2009).

Stigmasterol bersama dengan senyawa lain diisolasi dari bagian pucuk *Ageratina pichinchensis* Var, Bustamenta. Uji Antijamur dilakukan terhadap jamur *Tricophyton rubrug*, *Tricophyton mentagrophytes*, *Aspergillus niger* dan *Candida albicans*, nilai Konsentrasi Hambatan Minimum untuk stigmasterol berturut-turut adalah 12,5; 12,4; 100; 25 (ug/mL) (Guadarrama, 2009). Stigmasterol bersama dengan yang lainnya diisolasi dari *Hibiscus tiliaceus* dan dilakukan uji antikanker, memberikan IC50 besar dari 50 ug/mL terhadap P-388 dan / atau HT-29 jalur sel in vitro (Chen, 2006)

2.7. Metoda MTT

Metoda ini adalah uji kolorimetri yang mengukur pengurangan warna kuning dari 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium bromide (MTT) oleh suksinat mitokondria dehidrogenase. MTT memasuki sel dan masuk ke dalam mitokondria di mana dia direduksi menjadi formazan, tidak larut, berwarna ungu tua. Sel-sel kemudian terlarut dengan pelarut organik (misalnya. isopropanol) dan dirilis, solubilised reagen formazan diukur spektrofotometri. Sejak reduksi MTT hanya dapat terjadi pada sel-sel yang aktif secara metabolik, tingkat aktivitas adalah ukuran kelangsungan hidup sel (Baia et al., 2016; Saravanan et al 2003; Gerlier et al., 1986; Patels et al., 2009). Perubahan MTT menjadi formazan dapat dilihat pada gambar 2.5.



Gambar 2.2 Reaksi Perubahan MTT Menjadi Formazan
 Sumber: Baia et al., 2016

Metoda Metil Tiazol Tetrazolium (MTT Assay) berawal dari metoda proliferasi sel dan sitotoksitas yang sederhana, kemudian dikembangkan oleh Mosmann T pada tahun 1983. Sekarang digunakan secara luas di laboratorium sel di seluruh dunia (Baia et al., 2016). Metoda ini memiliki keunggulan yaitu sensitif, reproduktifitas, mudah dilakukan (Ferrai et al., 1990; Berridge et al., 2005; Yang et al., 2015).

MTT assay kolorimetri adalah metode mapan menentukan jumlah sel yang layak dalam studi proliferasi dan sitotoksitas. pengujian ini didasarkan pada pembelahan garam tetrazolium kuning (MTT), untuk membentuk larutan biru dari formazan oleh enzim mitokondria, dan jumlah formazan yang dihasilkan berbanding lurus dengan jumlah sel yang hidup, tidak sel mati yang hadir saat terpapar MTT. Karena assay MTT cepat, nyaman, dan ekonomis, telah menjadi teknik yang sangat populer untuk kuantifikasi sel yang layak dalam kultur. (Sylvester, 2011; Misra et al., 2013; Riss et al., 2015).

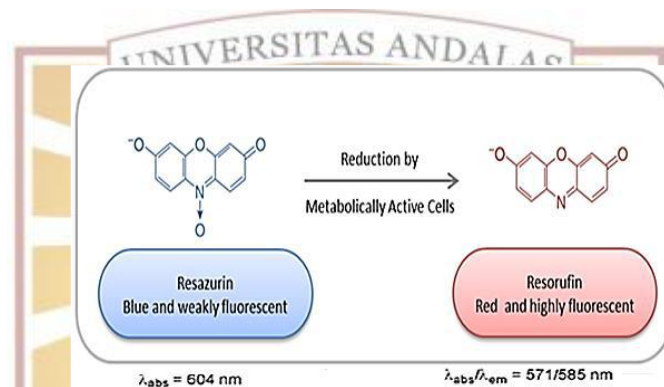
Suatu garam tetrazolium telah digunakan untuk mengembangkan alat tes kolorimetri kuantitatif untuk kelangsungan hidup sel mamalia dan proliferasi. Assay atau metoda ini mendeteksi sel hidup, tidak sel-sel mati dan sinyal yang dihasilkan tergantung pada tingkat aktivasi sel. Metode ini karena itu dapat digunakan untuk mengukur sitotoksitas, proliferasi atau aktivasi. Hasil dapat dibaca pada multiwell scanning spektrofotometer (ELISA reader) atau mikroplate reader dan menunjukkan tingkat presisi yang tinggi. Tidak ada langkah cuci yang digunakan dalam pengujian tersebut. Keuntungan utama dari uji kolorimetri yang kecepatan dan ketepatan, tanpa radioisotop apapun. Kami telah menggunakan assay untuk mengukur limfokin proliferasi, stimulasi mitogen dan melengkapi dimediasi lisis (Mosmann, 1983).

2.8. Metoda REMA

Metoda Resazurin Mikrotiter Assay (REMA) adalah pengujian menggunakan kolorimetri oksidasi-reduksi indikator resazurin, warna biru dalam kondisi teroksidasi, dan berubah menjadi resofurin warna merah muda ketika direduksi oleh sel-sel yang layak. Metoda ini untuk penentuan Konsentrasi Hambatan Minimum (KHM). Pengujian ini lebih murah dan cepat dengan spesifikasi yang baik dan peka (Chopra et al., 2016).

Resazurin (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-satu-10-oksida) Resazurin larut dalam air, tidak beracun dan sangat stabil dalam media kultur, dan juga relatif murah. Pengujian sampel non-polar atau sampel yang tidak mudah berdifusi ke

agar bisa dilakukan. Deteksi visual lebih mudah dan penentuan Konsentrasi Hambatan Minimum (KHM) dapat dilakukan secara akurat. Untuk mendapatkan warna dalam tes kolorimetri lainnya, misalnya pada metoda MTT, sel dipecah dengan menggunakan asam organik sementara di REMA perubahan warna langsung (Suryavanshi, 2016). Reaksi oksidasi dari resazurin dapat dilihat pada gambar 2.6.



Gambar 2.3 Reaksi Oksidasi dari Resazurin
Sumber: (Suryavanshi, 2016).

Metode REMA plat ini sangat mirip dengan Alamar uji biru, interpretasi hasil sangat mudah, dapat diuji dalam medium cair. Lebih murah daripada Alamar biru, mudah diterapkan di pengaturan sumber daya rendah. Memiliki keunggulan tambahan bahwa hal itu tidak memerlukan penyerapan oleh sel bakteri, salah satu perhatian utama dengan jenis uji keamanan hayati. Telah terbukti, bagaimanapun, bahwa uji dapat dengan mudah disesuaikan dengan format tabung tertutup, sehingga menghindari masalah kontaminasi. Singkatnya, kami telah menemukan metode REMA menjadi teknik yang cepat, sederhana, dan murah untuk

mendeteksi isolat sebagai anti infeksi Tuberkulosa, terutama di negara-negara berpenghasilan rendah ([Palomino, 2002](#)).

REMA adalah metode non-konvensional dan murah, cepat dan dapat berfungsi sebagai pengganti metode proporsi di rangkaian sumber daya terbatas, pengujiannya memberikan metode skrining yang ideal untuk laboratorium Tuberkulosa (Nour et al, 2013; Umubyeyi et al., 2006). Assay berbasis resazurin ini adalah sederhana, dengan akurasi diagnostik yang sangat tinggi, mudah digunakan di negara-negara terbatas (Chauca et al., 2007) dalam (Francis et al., 2015).



BAB III. METODA PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu

Tanaman yang digunakan untuk penelitian berasal dari kota Bengkulu yang diambil berdekatan dengan Taman Hutan Raya Rajolelo Bengkulu. Pengumpulan, perajangan dan pengeringan dilakukan di Bengkulu. Identifikasi simplisia tanaman dilakukan di laboratorium Herbarium Biologi FMIPA Unand, Padang. Skrining Fitokimia, ekstraksi, isolasi, pemurnian dan karakterisasi senyawa serta destilasi pelarut dilakukan di laboratorium Kimia Organik Bahan Alam FMIPA Unand, Padang. Perekaman spektrum UV-vis senyawa dilakukan di laboratorium Biota Sumatera Unand, Padang. Perekaman spektrum FTIR senyawa dilakukan di laboratorium Instrumen FPMIPA UNP, Padang. Perekaman spektrum LC-MS dan H^1/ C^{13} -NMR senyawa dilakukan di laboratorium LIPI Serpong, Tangerang Selatan. Uji Antikanker sel P388 senyawa dilakukan di laboratorium Kimia ITB, Bandung. Uji Antibakteri dan Antijamur senyawa dilakukan di laboratorium FMIPA Unri, Pekanbaru. Pelaksanaan penelitian ini dimulai bulan Januari 2012 sampai dengan bulan Desember 2015.

3.2. Bahan dan Alat

3.2.1. Bahan Kimia

Bahan kimia untuk pelarut atau eluen: jenis teknis yang telah diredestilasi yaitu: n-heksan (heksan), diklorometana (DCM), etil asetat (EtOAc), aseton, butanol (butanol), methanol dan aquades. Bahan kimia silika gel untuk khromatografi: silika gel 60 (Merck), silika gel 60 G (Merck), silika gel 60 PF2 + 366 mengandung CaSO_4 untuk preparatif (Merck), silika gel 60 PF containing Gypsum untuk khromatotron (Merck) dan Plat KLT (Silica gel 60 F254 25 TLC aluminium sheets 20 X 20 cm, Merk). Bahan kimia untuk skrining fitokimia: pereaksi Liebermann-Burchard (asam asetat-anhidrida, H_2SO_4 pekat), pereaksi synode test (HCL pekat, serbuk Mg), NaOH 10 %, FeCl_3 5 %, HCl pekat, iod, peraksi Mayer. Bahan kimia untuk bioaktifitas: Phosphat Buffer Saline (PBS), Media Kultur RPMI 1640 konsentrasi 5×10^6 sel/mL, DMSO, MTT 5mg/mL PBS (50 mg MTT and 10 mL PBS), SDS 10% dalam 0,1 N HCl, Tissue makan, Aluminium foil, FBS (Fetal Bovin Serum), Kanamisin, Artonin-E 0,4 $\mu\text{g/ml}$, Media Uji (Nutrien Broth) (Merck), Air salin (0,85 % NaCl) (Merck), Resazurin (Sigma), Aquades steril, artonin E, Cefadroxil dan ketoconazole.

3.2.2. Bahan Mikroorganisme

Mikroorganisme untuk uji bioaktifitas adalah sel Murine Leukemia P 388. Bateri uji: *Escherichia Coli* (LPKOK UR CC 13) (Gram Negatif), *Pseudomona Aeruginosa* (LPKOK UR CC 15) (Gram Negatif), *Staphylococcus Aureus* (LPKOK

UR CC 14) (Gram Positif), dan *Basillus Subtilis* (LPKOK UR CC 16) (Gram Positif). Jamur uji: *Aspergillus niger*, *Tricophyton mentagrophytes*, *Candida albicans* dan *Epidermo floccosum*.

3.3. Peralatan

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini yang bersifat umum: gelas kimia, erlemeyer, gelas ukur, corong, tabung reaksi, plat tetes, batang pengaduk spatula, pinset, penjepit tabung reaksi, neraca, oven, refrigerator, lampu spiritus, labu ukur, incubator, vial, sentrifuge, ultrasonik, penangas air. Peralatan untuk ekstraksi/isolasi: botol maserasi, corong pisah, rotary evaporator, kromatografi vakum cair (KVC), kromatografi grafitasi, kromatografi tekan, kromatografi preparatif plat kaca, kromatografi preparatif plat aluminium, chamber, dan lampu UV. Peralatan untuk karakteristik senyawa: melting point, spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu UV-VIS 1700), FTIR (PERKIN ELMER 74845TCH) dan NMR (H1, C13, DEPT, HMQC, HMBC dan COSY) JEOL NMR JNM ECA-500. Freeze, Tabung Dewar, Waterbath, Mikroskop, Plat sumur 96, inkubator, Sentrifuge, Mikropipet, Mikroplat mixer, Pipet pasteur steril, Mikroplat reader, Pipet Mikro *Multi Chanel*, Tips Pipet Mikro, Jarum Ose, Books Steril Kaca

3.4. Metoda

3.4.1. Penetapan Tanaman

3.4.1.1. Penelusuran Tanaman

Informasi mengenai tanaman yang digunakan sebagai sampel diperoleh melalui wawancara dengan seorang petugas Taman Hutan Raya Rajolelo kota

Bengkulu dengan cara mengajukan pertanyaan langsung tentang tumbuhan yang diketahui oleh petugas yang dapat memberikan khasiat untuk kesehatan tubuh. Pertanyaan yang diajukan adalah : nama nama tanaman, bagian yang digunakan, fungsinya dan cara pemakaian. Seleksi satu spesies tanaman yang akan diteliti dipersiapkan sebanyak 7 spesies. Semua spesies tanaman diidentifikasi dan dilanjutkan seleksi melalui akses internet. Seleksi diprioritaskan berdasarkan jumlah jenis senyawa paling sedikit dari penelitian yang dilaporkan.

3.4.1.2. Identifikasi Tanaman

Simplisia dari tanaman hasil seleksi diusahakan memenuhi kriteria untuk dijadikan herbarium yaitu berupa setangkai daun yang memiliki bunga atau buah. Selanjutnya dilakukan identifikasi di laboratorium Herbarium Prodi Biologi FMIPA Unand. Hasil identifikasi tertuang pada surat Nomor 106/K-ID/ANDA/VI/2012, nama tanaman adalah *Callicarpa arborea* Roxb termasuk famili *Verbenaceae*.

3.4.2. Pengumpulan dan Pengolahan Sampel

Bagian tanaman yang digunakan untuk penelitian adalah kulit batang dari *Callicarpa arborea* Roxb dengan pemilihan secara prioritas bahwa tanaman terjaga kelangsungan keberadaannya yaitu berumur cukup tua, kulit batang yang diambil pada posisi tertentu. Kulit batang dikumpulkan dari beberapa pohon, kemudian dibersihkan dan dipotong-potong ukuran kecil, didapatkan sebanyak 12 kg berat basah. Sampel dikering anginkan di udara terbuka tanpa cahaya matahari

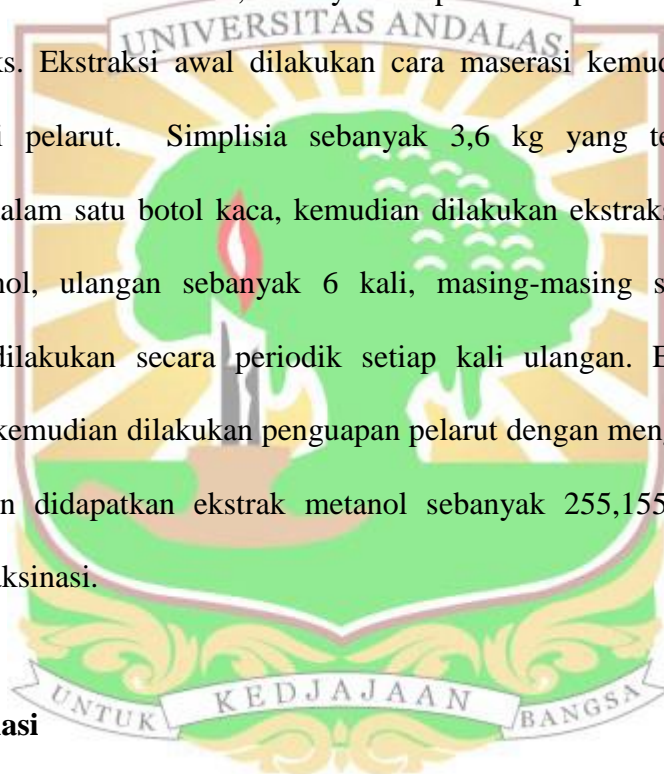
selama 3 minggu, selanjutnya dihaluskan dengan mesin penghancur, didapatkan sebanyak 3,6 kg berat kering dan ditempatkan pada wadah yang bersih untuk diekstraksi.

3.4.3. Ekstraksi

Ekstraksi bertujuan untuk menarik atau memisahkan komponen kimia yang terdapat dalam sel tanaman, hasilnya merupakan campuran komponen kimia yang kompleks. Ekstraksi awal dilakukan cara maserasi kemudian dilanjutkan cara ekstraksi pelarut. Simplisia sebanyak 3,6 kg yang telah dihaluskan ditempatkan dalam satu botol kaca, kemudian dilakukan ekstraksi cara maserasi dengan metanol, ulangan sebanyak 6 kali, masing-masing selama 24 jam. Pengadukan dilakukan secara periodik setiap kali ulangan. Ekstrak metanol dikumpulkan kemudian dilakukan penguapan pelarut dengan menggunakan rotary evaporator dan didapatkan ekstrak metanol sebanyak 255,155 g, siap untuk dilanjutkan fraksinasi.

3.4.4. Fraksinasi

Ekstrak metanol sebanyak 240 g selanjutnya difraksinasi secara ekstraksi pelarut menggunakan corong pisah (Amin, 1997). Ekstrak metanol diencerkan kembali dengan metanol, kemudian difraksinasi dengan pelarut berbeda secara bergantian, terpisah dan berurutan sesuai dengan tingkat kepolaran pelarut semakin meningkat yaitu: n-heksana, diklorometana, etil asetat dan n-butanol. Masing-masing pelarut yang digunakan diulang sebanyak 10 kali. Pada pengerjaan



fraksinasi pelarut n-heksana dan diklorometana dua lapisan terpisah sendiri, akan tetapi pada pengerjaan fraksinasi pelarut etil asetat dan n-butanol diperlukan penambahan aquabides secukupnya untuk kemudahan pemisahan dua lapisan. Masing-masing fraksi dikumpulkan secara terpisah kemudian pelarutnya diuapkan menggunakan rotary evaporator dan hasilnya ditimbang.

3.4.5. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia adalah suatu pendeteksian awal terhadap kandungan senyawa kimia yang mungkin terdapat dalam suatu tanaman. Kegiatan ini dilakukan untuk uji golongan senyawa Terpenoid, steroid, kumarin, fenolik, tannin, saponin, flavonoid dan alkaloid. Skrining fitokimia dilakukan dengan metoda yang umum digunakan terhadap variasi ekstrak (Haborn, 1996; Amin, 2013; Anh, 2014; Kumar, 2013; Norman, 1996; Santoni, 2009; Satheesh, 2012; Wadood, 2013; Yadav, 2011; Zohra, 2012;).

Sampel kering dari kulit batang *Callicarpa arborea* Roxb sebanyak 15 g dirajang dan digerus dalam lumpang porselen sampai menjadi serbuk. Sampel serbuk 10 g dalam erlemeyer, ditambahkan metanol 20 ml, dipanaskan dibawah titik didih selama 10 menit sambil dikocok, disaring saat panas, filtrat diuapkan. Residu ditambahkan khloroform : air (1:1) sebanyak 10 ml sambil dikocok, diamkan samapi terbentuk 2 lapisan. Lapisan chloroform untuk uji triterpenoid, steroid dan kumarin. Lapisan air untuk uji fenolik dan saponin. Sisa dari lapisan air diuapkan, kemudian dipartisi dengan etil asetat, fraksi etil asetat ini untuk uji flavonoid.

Uji Triterpenoid/steroid (metoda Liebermann-Burchard)

Beberapa tetes ekstrak ditempatkan ke dalam plat tetes, tambahkan anhidrida asam asetat beberapa tetes dan tambahkan 1-2 tetes asam sulfat pekat. Terjadinya warna kemerahan/pink menunjukkan adanya triterpenoid dan warna ungu menjadi biru kehijauan menunjukkan adanya steroid.

Uji Kumari (metoda NaOH)

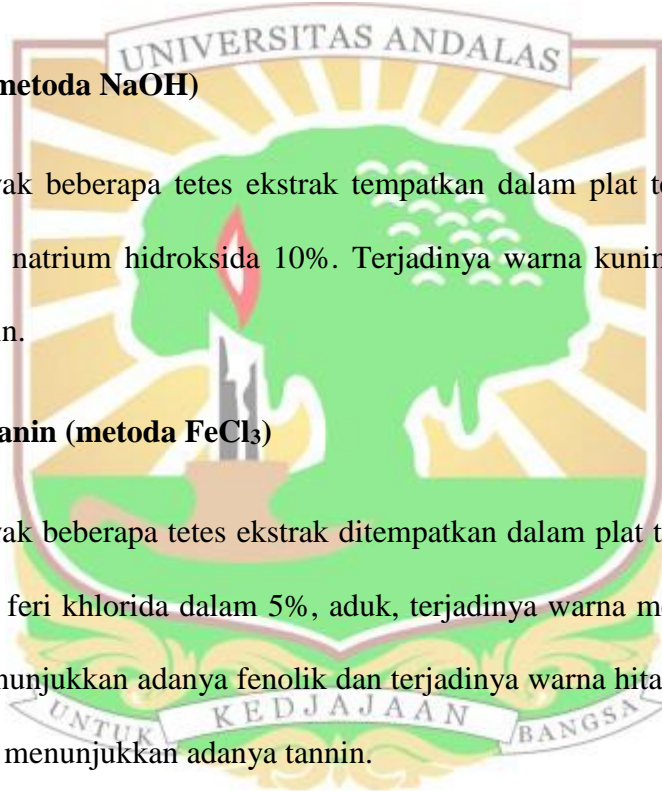
Sebanyak beberapa tetes ekstrak tempatkan dalam plat tetes, tambahkan beberapa tetes natrium hidroksida 10%. Terjadinya warna kuning menunjukkan adanya kumarin.

Uji Fenolik/Tanin (metoda FeCl₃)

Sebanyak beberapa tetes ekstrak ditempatkan dalam plat tetes, tambahkan beberapa tetes feri klorida dalam 5%, aduk, terjadinya warna merah atau merah kehitaman menunjukkan adanya fenolik dan terjadinya warna hitam kebiruan atau hijau kebiruan menunjukkan adanya tannin.

Uji Saponin (metoda busa)

Sebanyak 1 ml ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi, tambahkan air 5 ml, kocok kuat-kuat. Terbentuknya busa setinggi 4 cm stabil menunjukkan adanya saponin.



Uji Flavonoid (metoda Sinoda)

Sebanyak 1 ml ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi, tambahkan beberapa tetes asam klorida pekat, tambahkan serbuk magnesium secukupnya, kocok dan panaskan 5 menit. Terbentuknya warna merah atau oranye menunjukkan adanya flavonoid.

Uji Alkaloid (metoda Mayer)

Sampel serbuk 5 g, ditambahkan 10 ml larutan kloroform amoniak 0,05 M, diaduk, disaring. Filtrat 5 ml masukkan, ditambahkan 0,5 ml asam sulfat 2 N, kocok beberapa saat, diamkan sampai terbentuk 2 lapisan, ambil lapisan asam, tambahkan dalam tabung reaksi. Sebanyak 1 ml ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan pereaksi Mayer. Terbentuknya kabut sampai endapan putih beberapa tetes asam klorida pekat, tambahkan reagen Mayer secukupnya. Terjadinya endapan putih menunjukkan adanya alkaloid.

3.4.6. Pemisahan, Pemurnian dan Uji Kemurnian Kristal-1

3.4.6.1. Pemisahan dan Pemurnian Kristal-1

Kristal Kristal-1 berasal dari fraksi n-heksana; fraksinasi lanjutan dilakukan terhadap fraksi n-heksana dengan metoda kromatografi vakum cair (KVC). Sampel sebanyak 11 g dilarutkan dengan diklorometana secukupnya, kemudian diimpresinasi ke silika gel (12 g) secara homogen sampai kering. Kolom KVC yang digunakan diameter 4 cm, diisi dengan silika gel sebanyak 15 g, tinggi 2,5 cm. Elusi dilakukan dengan pelarut n-heksana dan etil asetat secara peningkatan kepolaran pelarut cara bertahap yaitu 5%. Fraksi ditampung dengan

vial nomor 1 – 39. Fraksi didapatkan adalah F1 (1-4), F2 (5-12), F3 (13-23), F4 (24-37) dan F5 (38-39).

Pada F2 khususnya terhadap vial 8-10 dilakukan tindakan pencucian. Sampel di dalam vial tersebut berwarna hijau dan coklat kehitaman. Pencucian pertama dilakukan dengan pelarut n-heksana, sampai warna hijau hilang. Pencucian kedua dilakukan dengan pelarut diklorometana sampai warna coklat kehitaman hilang dan sampel bening putih, didapka sebanyak 70 mg.

Pemurnian dilanjutkan cara rekristalisasi menggunakan metanol yang dipanaskan, saring, filtrat dibiarkan dingin sampai mengkristal, didekantasi, kristal dicuci dengan metanol dingin, kristal diuapkan sampai kering, hasil ditimbang dan disebut sebagai Kristal-1.

3.4.6.2. Uji Kemurnian Kristal-1

3.4.6.2.1. Uji Kemurnian Kristal-1 Metoda KLT Satu Dimensi

Uj kemurnian terhadap kristal-1 dilakukan dengan metoda kromatografi lapisan Tipi (KLT) satu dimensi menggunakan 3 jenis eluen secara terpisah yaitu n-heksana : etil asetat (9:1), n-heksana : aseton (8:2) dan diklorometana : etil asetat (8:2). Prosedur sebagai berikut:

(1). Eluen dibuat dengan cara penjampuran pelarut dengan perbandingan yang telah ditetapkan.

(2). Sampel dilarutkan secukupnya, sampel ditotolkan pada garis pensil yang telah ditetapkan pada KLT ukuran 1 x 7 cm, biarkan sesaat mengering.

(3). Sampel dielusi sampai eluen mencapai garis pensil bagian atas plat KLT.

(4). Penampakan noda dideteksi secara berurutan dan terpisah yaitu dengan lampu UV gelombang pendek, lampu UV gelombang panjang, uap iod, asam sulfat 10 % dan dengan berbagai pereaksi golongan senyawa, noda yang nampak dilingkari dengan pensil. Faktor retensi (R_f) dihitung.

Elusi terhadap kristal NADP-1 dilakukan dengan ketiga eluen tersebut di atas dengan prosedur yang sama.

3.4.6.2.2. Uji Kemurnian Kristal-1 Metoda KLT Dua Dimensi

Uji kemurnian ini menggunakan KLT ukuran 7 x 7 cm dan dua eluen berbeda dilakukan secara terpisah yaitu eluen pertama n-heksana : aseton (7:3) dan eluen kedua n-heksana : etil asetat (7: 3) dengan prosedur sebagai berikut:

(1) Eluen dibuat dengan pencampuran pelarut yang telah ditetapkan dan dituangkan ke dalam cember.

(2). Sampel dilarutkan secukupnya, lalu ditotolkan pada KLT di atas garis pensil yang telah ditetapkan.

(3). Sampel dielusi sampai eluen mencapai garis pensil bagian atas plat KLT.

(4). Noda dideteksi dengan teknik yang sesuai agar noda sampel tidak rusak yaitu dengan uap iod, R_f dihitung.



(5). Elusi dilanjutkan terhadap KLT di atas dengan menggunakan eluen komposisi berbeda yang telah disiapkan, tetapi posisi KLT diputar 90^0 , prosedur sama seperti tahap (1) –(5).

3.4.6.2.3. Uji Kemurnian Kristal-1 Metoda Titik Leleh

Metoda ini memiliki teknik pipa kapiler posisi horizontal dengan prosedur kerja sebagai berikut:

(1). Sampel dimasukkan ke dalam pipa kapiler 2-3 butir.

(2). Alat titik leleh dialiri listrik, temperatur diatur

(4). Pipa kapiler berisi sampel Kristal-1 ditempatkan pada posisi tertentu dan dapat dimonitor melalui suatu jendela lensa, sampai sampel meleleh semuanya, titik leleh sampel dicatat.

3.4.7. Pemisahan, Pemurnian dan Uji Kemurnian Kristal-2

3.4.7.1. Pemisahan dan Pemurnian Kristal-2

Kristal M2 berasal dari fraksi diklorometana; fraksinasi lanjutan dilakukan terhadap fraksi diklorometana yaitu sampel sebanyak 7,5 g dilarutkan dengan diklorometan sambil diaduk, terdapat larutan dan residu, kemudian disentrifus, filtrat dikumpulkan dan diuapkan dengan rotary evaporator, didapatkan padatan sebanyak 1,735 g.

Fraksinasi berikutnya dilakukan dengan metoda kromatografi vakum cair (KVC). Sampel sebanyak 1,735 g dilarutkan dengan pelarut campuran diklorometana : etil asetat (1:1) secukupnya sampai mendekati jenuh, kemudian

dipreadsorbsikan ke silika gel (2 g) secara homogen sampai kering. Kolom KVC yang digunakan diameter 4 cm, dipeking dengan silika gel 30 g secara basah, tinggi peking 5 cm. Eluen yang terdiri dari n-heksana dan etil asetat, elusi dilakukan dengan perubahan peningkatan kepolaran eluen secara bertahap (10 % volume) dan diakhiri dengan aseton dan metanol secara terpisah dan berurutan. Fraksi ditampung dengan vial nomor 1 – 73 masing-masing sebanyak 25 ml. Fraksi yang didapatkan adalah F0 (1-12), F1 (13-14), F2 (15-20), F3 (21-32), F4 (33-50) dan F5 (51-65).

Pada F2 (15-20) terdapat padatan sebanyak 135 mg, fraksinasi selanjutnya dilakukan dengan metoda kromatografi tekan. Sampel 135 mg dilarutkan dengan pelarut campuran etil asetat : metanol (4:1) secukupnya sampai mendekati jenuh, kemudian dipreadsorbsikan ke silika gel 300 mg sambil digerus secara homogen sampai kering. Kolom kromatografi tekan diameter 2,5 cm, dipeking dengan silika gel 15 g secara basah dan secara isokratik dengan eluen diklorometana : etil asetat (98:2) untuk vial nomor 1-97 dan eluen diklorometana : etil asetat (1:1) untuk vial nomor 98-99. Fraksi didapatkan adalah F1 (19-42), F2 (43-91) dan F3 (94-99).

Pada F2 (43-91) didapatkan padatan sebanyak 36 mg, isolasi selanjutnya dilakukan dengan metoda kromatografi preparatif plat kaca ukuran 20 x 20 cm, yang dibuat sendiri. Sampel 36 mg dilarutkan dengan pelarut campuran etil asetat : metanol (4:1) secukupnya sampai mendekati jenuh, kemudian ditotolkan secara kontinyu. Uji eluen yang sesuai dilakukan terlebih dahulu dengan uji KLT, eluen n-heksana : etil asetat (7:3) dapat memisahkan komponen sasaran dari yang

lainnya, oleh karena itu eluen tersebut digunakan untuk elusi. Penampakan noda digunakan iodium, memberikan warna coklat dan ditandai serta dikerok. Hasil silika gel yang dikerok, diekstrak dengan cara dilarutkan dengan pelarut campuran etil asetat : metanol (4:1) sambil diaduk, kemudian disentrifus. Ekstraksi dilakukan ulangan sebanyak 6 kali, filtrat dikumpulkan dan pelarut diuapkan sampai kering, didapatkan kristal warna putih sebanyak 10,213 mg dan disebut sebagai Kristal-2.

3.4.7.2. Uji Kemurnian Kristal-2

Uji kemurnian kristal-2 menggunakan metoda KLT 1 dengan 3 jenis eluen yaitu n-heksana : etil asetat (8:2), n-heksana : aseton (7:3) dan diklorometana : etil asetat (8:2). Kemudian dilanjutkan menggunakan metoda 2 dimensi dengan 2 jenis eluen yaitu n-heksana : etil asetat (7:3) dan diklorometana : etil asetat (9:1). Uji titik leleh juga dilakukan terhadap kristal ini. Prosedurnya sama seperti pada uji kemurnian pada 3.4.6.2 Uji (Kemurnian Kristal-1).

3.4.8. Pemisahan, Pemurnian dan Uji Kemurnian Kristal-3

3.4.8.1. Pemisahan dan Pemurnian Kristal-3

Kristal M3 berasal dari fraksi etil asetat; fraksinasi lanjutan dilakukan terhadap fraksi etil asetat yaitu sampel sebanyak 28 g dilarutkan dengan diklorometan, terdapat larutan dan residu, kemudian disentrifus, filtrat dikumpulkan dan diuapkan dengan rotary evaporator, didapatkan padatan sebanyak 1,200 g. Fraksinasi berikutnya dilakukan dengan metoda kromatografi

vakum cair (KVC). Sampel sebanyak 1,200 g dilarutkan dengan diklorometana secukupnya, kemudian dipreadsorbsikan ke silika gel (1,5 g) secara homogen sampai kering. Kolom KVC yang digunakan diameter 4 cm, dipeking dengan silika gel 30 g, tinggi peking 5 cm. Eluen yang terdiri dari n-heksana dan etil asetat, elusi dilakukan dengan perubahan peningkatan kepolaran eluen secara bertahap dan diakhiri dengan aseton. Fraksi ditampung dengan vial nomor 1 – 41. Fraksi yang didapatkan adalah F1 (2-3), F2 (4-11), F3 (12-19), F4 (20-33) dan F5 (34-41).

Pada vial nomor 6 terdapat padatan warna kuning berupa batangan yang terpisah dari padatan lainnya sebanyak 42 mg. Isolasi selanjutnya dilakukan terhadap padatan warna kuning dengan metoda kromatografi preparatif dengan menggunakan KLT plat aluminium ukuran 10 X 20 cm. Uji eluen yang sesuai dilakukan terlebih dahulu dengan uji KLT, eluen n-heksana : etil asetat (7:3) dapat memisahkan warna kuning dari yang lainnya. Sampel dilarutkan dengan etil asetat secukupnya sampai mendekati jenuh, kemudian ditotolkan secara kontinyu dan dielusi di dalam cember dengan eluen n-heksana : etil asetat (7:3). Noda warna kuning dikerok dari plat KLT dan diekstrak dengan etil asetat dengan cara melarutkan silika gel hasil kerokan dengan etil asetat sambil diaduk, kemudian disentrifus. Ekstraksi dilakukan ulangan sebanyak 6 kali, filtrat dikumpulkan dan pelarutnya diuapkan, didapatkan kristal sebanyak 9,530 mg dan disebut sebagai Kristal-3.

3.4.8.2. Uji Kemurnian Kristal-3

Uji kemurnian kristal-3 menggunakan metoda KLT 1 dengan 3 jenis eluen yaitu n-heksana : etil asetat (8:2), n-heksana : aseton (7:3) dan diklorometana : etil asetat (8:2). Kemudian dilanjutkan menggunakan metoda 2 dimensi dengan 2 jenis eluen yaitu n-heksana : etil asetat (6:4) dan diklorometana : etil asetat (8:2). Uji titik leleh juga dilakukan terhadap kristal ini. Prosedurnya sama seperti pada uji kemurnian pada 3.4.6.2 Uji (Kemurnian Kristal-1).

3.4.9. Penentuan Struktur Kristal-1, Kristal-2 dan Kristal-3

Penentuan struktur senyawa hasil isolat ditentukan berdasarkan karakterisasi cara fisika, kimia dan spektroskopi IR, UV-Vis dan NMR 1 dan 2 dimensi.

3.4.10. Uji Antikanker Kristal-1, Kristal-2 dan Kristal-3 Terhadap Sel Murine Leukemia P 388 dengan Metoda MTT

Uji antikanker ini dilakukan terhadap ketiga kristal secara terpisah dan waktu bersamaan, prosedur sebagai berikut:

1. Sel P 388 dibiakkan dalam media RPMI 1640, 5 % FBS dan kanamisin 100 µg/ml.
2. Sel P 388 (3×10^3 sel/sumur) dikultur dalam mikropate yang mengandung 100 µL media pertumbuhan per sumur dan diinkubasi pada 37°C dalam kelembaban atmosfer 5% CO², selama 48 jam.

3. Sampel (10 μ l) dengan seri konsentrasi adalah 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100 μ g/ml masing-masing ditambahkan ke dalam plat sumur yang sesuai dengan label yang telah dicantumkan pada plat sumur, diinkubasi kembali selama 48 jam.
4. Larutan MTT (5 mg/ μ l) sebanyak 20 μ L ditambahkan per sumur media kultur dan diinkubasi kembali selama 4 jam, pastikan formazan sudah terbentuk.
5. Larutan SDS-0,01 N HCl sebanyak 100 μ L ditambahkan ke dalam plat sumur kultur, diinkubasi kembali selama 24 jam.
6. Formazan yang terbentuk berupa padatan, dilarutkan dengan pengadukan menggunakan mikropipet.
7. Optical densiti diukur menggunakan mikroplate reader pada daerah panjang gelombang 550/ 700 nm.
8. IC50 dihitung cara memplotkan data konsentrasi ke data optical densiti menggunakan program cricket.



3.4.11. Uji Antibakteri Kristal-1, Kristal-2 dan Kristal-3 Menggunakan Metoda REMA

Uji antibakteri ini dilakukan terhadap ketiga senyawa secara terpisah dan waktu bersamaan, prosedur sebagai berikut:

1. Bakteri *Escheria Coli*, *Pseudomona Aeroginosa*, *Staphylococcus Aureus* dan *Basillus Subtilis* masing-masing dibiakkan dalam tabung reaksi yang

terpisah yang telah berisi media NB, tabung ditutup dengan kapas, kemudian diinkubasi pada temperatur 37⁰C selama 24 jam.

2. Suspensi bakteri sebanyak 10⁻⁶ CFU/mL dalam larutan NaCl fisiologis 0,85 %, masing-masing secara terpisah diukur melalui penyetaraan dari nilai Optical Density 0,8 – 1,0 dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm, disiapkan untuk bakteri uji.
3. Pada mikrolat sumur 96; 5 sumur baris teratas, 4 diisi masing-masing dengan 90 µL media NB, sumur 1 – 3 ditambahkan 10 µL sampel 100 µg/mL (triplo sampel), sumur ke 4 ditambahkan 10 µL Cepradoxil 100 µg/mL (kontrol positif). Seri konsentrasi sampel dan kontrol positif dibuat menggunakan metoda *two fold dilution* (setengah dari konsentrasi awal) dengan pengenceran penambahan 50 µL media NB dari baris atas ke arah baris bawah dari mikrolat sumur 96, sehingga dihasilkan seri konsentrasi (µg/mL): 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,1563; 0,0781. Kemudian ditambahkan 10 µL suspensi bakteri 10⁻⁶ CFU/mL ke semua sumur sampel. Sumur ke 5 diisi dengan 50 µL media NB (kontrol negatif, sebagai kontrol pertumbuhan bakteri). Kemudian semua sumur sampel, kontrol positif dan kontrol negatif ditambahkan 10 µL resazurin 6,75 mg/mL. Kemudian diinkubasi pada temperatur 37⁰C selama 24 jam.
4. Konsentrasi hambatan minimum (KHM) ditentukan berdasarkan pengamatan warna biru dalam sumur mikrolat, yaitu warna biru yang memiliki konsentrasi terkecil dari sampel dan kontrol positif.

3.4.12. Uji Antijamur Kristal-1, Kristal-2 dan Kristal-3 Menggunakan Metoda REMA

Uji antijamur ini dilakukan terhadap ketiga senyawa secara terpisah dan waktu bersamaan, prosedur sebagai berikut:

1. Jamur *Aspergillus niger*, *Tricophyton mentagrophytes*, *Candida albicans*, *Epidermo floccosum* masing-masing dibiakkan dalam tabung reaksi yang terpisah yang telah berisi media WP, tabung ditutup dengan kapas, kemudian diinkubasi pada temperatur 37⁰C selama 24 jam.
2. Suspensi jamur sebanyak 10⁻⁶ CFU/mL dalam larutan NaCl fisiologis 0,85 %, masing-masing secara terpisah diukur melalui penyetaraan dari nilai Optical Density 0,8 – 1,0 dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm, disiapkan untuk jamur uji.
3. Mikroplat sumur 96; 5 sumur baris teratas, 4 diisi masing-masing dengan 90 µL media WP, sumur 1 – 3 ditambahkan 10 µL sampel 100 µg/mL (triplo sampel), sumur ke 4 ditambahkan 10 µL Cetoconazole 100 µg/mL (kontrol positif). Seri konsentrasi sampel dan kontrol positif dibuat menggunakan metoda *two fold dilution* (setengah dari konsentrasi awal) dengan pengenceran penambahan 50 µL media WP dari baris atas ke arah baris bawah dari mikroplat sumur 96, sehingga dihasilkan seri konsentrasi (µg/mL): 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,1563; 0,0781. Kemudian

ditambahkan 10 μL suspensi jamur 10^{-6} CFU/mL ke semua sumur sampel. Sumur ke 5 diisi dengan 50 μL media WP(kontrol negatif, sebagai kontrol pertumbuhan jamur). Kemudian semua sumur sampel, kontrol positif dan kontrol negatif ditambahkan 10 μL resazurin 6,75 mg/mL. Kemudian diinkubasi pada temperatur 37°C selama 24 jam.

4. Konsentrasi hambatan minimum (KHM) ditentukan berdasarkan pengamatan warna biru dalam sumur mikroplat, yaitu warna biru yang memiliki konsentrasi terkecil dari sampel dan kontrol positif.



BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Penetapan Spesimen Tanaman

Pemilihan tanaman untuk penelitian ini berdasarkan penelusuran tanaman oleh penulis dan petugas taman hutan di kawasan Taman hutan Rajolelo dan sekitarnya , bentiring, Bengkulu. Diperoleh 6 spesimen tanaman yang akan dipilih salah satunya untuk penelitian, mereka adalah:



Pemilihan tanaman yang akan diteliti pada awalnya berdasarkan prioritas tanaman yang belum diteliti namun hal ini tidak didapatkan dan dilanjutkan berdasarkan prioritas tanaman yang kajiannya kimianya relatif masih sedikit dilaporkan. Identifikasi spesimen tanaman dilakukan di Herbarium Universitas Andalas (Uanand) jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA).

Berdasarkan identifikasi spesimen yang dilakukan Herbarium Unand jurusan Biologi FMIPA melalui surat nomor 106/K-ID/ANDA/VI/2012, tanggal 22 Juni 2012.

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)

Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)

Super Difisi : Spermatophyta

Difisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)

Kelas : Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)

Subkelas : Asteridae

Ordo : Lamiales

Famili : Verbenaceae

Genus : *Callicarpa*

Spesies : *Callicarpa arborea* Roxb



4.2. Pengumpulan dan Pengolahan Sampel Tanaman

Kulit batang dipilih dari tanaman relatif tua, posisi pengambilan dengan mempertimbangkan kelangsungan hidup tanaman, dikumpulkan dari beberapa pohon, kemudian dibersihkan dan dipotong-potong ukuran kecil, didapatkan sebanyak 12 kg berat basah. Sampel dikering anginkan di udara terbuka tanpa cahaya matahari selama 3 minggu, selanjutnya dihaluskan dengan mesin penghancur, berat kering ditimbang didapatkan sebanyak 3,6 kg dan ditempatkan pada wadah yang bersih untuk diekstraksi. Berat kering sebanyak 3,6 kg, adalah 30 % dari berat basah atau kandungan air terdapat sebanyak 70 %, nilai kandungan air yang cukup besar dari suatu bahan jaringan kulit batang suatu tanaman.

4.3. Ekstraksi

Banyak metoda yang dapat digunakan untuk mengekstrak kandungan kimia dari jaringan tanaman. Pada penelitian ini dipilih metoda maserasi dan pelarut metanol. Bahan kering sebanyak 3,6 kg dimaserasi, kemudian ekstrak dikumpulkan dan dilakukan penguapan pelarut dengan menggunakan rotary evaporasi, didapatkan ekstrak metanol sebanyak 255,155 g atau sebanyak 7,083 % dari berat asal.

Estrak metanol ini diduga cenderung memiliki kandungan senyawa banyak bersifat polar, hal ini dikaitkan dengan lingkungan mereka pada jaringannya banyak kandungan air (70 %).

4.4. Fraksinasi

Ekstrak metanol sebanyak 240 g difraksinasi dengan metoda ekstraksi pelarut-pelarut (ekstraksi partisi) dengan menggunakan pelarut n-heksana, diklorometana, etil asetat dan n-butanol, dilakukan secara terpisah dan berurutan. Ekstrak masing-masing fraksi dikumpulkan secara terpisah kemudian pelarutnya diuapkan menggunakan rotary evaporator dan hasilnya ditimbang. Hasil fraksinasi dapat dilihat pada tabel 4.1.

Hasil fraksinasi menunjukkan bahwa ekstrak nonpolar (fraksi n-heksana dan diklorometana) memberikan hasil yang sedikit termasuk fraksi semipolar (fraksi etil asetat). Fraksi polar jumlahnya jauh lebih banyak, hal ini merupakan fakta memperkuat dugaan di atas bahwa kulit batang yang diteliti memiliki kandungan senyawa polar jumlah besar.

Tabel 4.1. Hasil Fraksinasi Dari Ekstrak Metanol Kulit Batang *Callicarpa arborea* Roxb (per berat kering)

n-Heksan	Diklorometana	Etil Asetat	n-Butanol
11,528 g	8,221 g	28,712 g	149 g
(0,32 %)	(0,22 %)	(0,79 %)	(4,13 %)

4.5. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia adalah suatu pendeteksian awal terhadap kandungan senyawa kimia yang mungkin terdapat dalam suatu tanaman. Pada kegiatan ini

dilakukan uji golongan senyawa triterpenoid, steroid, flavonoid, kumarin, fenolik, tannin, saponin dan alkaloid. Hasilnya dapat dilihat pada tabel 4.2.

Hasil skrining fitokimia ini jelas sekali menunjukkan bahwa kandungan senyawa kimia dalam kulit batang tanaman yang diteliti variasinya sedikit, hanya mengandung senyawa golongan triterpenoid, kumarin, fenolik dan tanin.

Tabel 4.2. Hasil Skrining Fitokimia dari Kulit Batang *Callicarpa arborea* Roxb

Golongan Senyawa	Hasil
Triterpenoid	+
Steroid	-
Kumarin	+
Phenolic	+
Tanin	-
Saponin	-
Flavonoid	-
Alkaloid	-

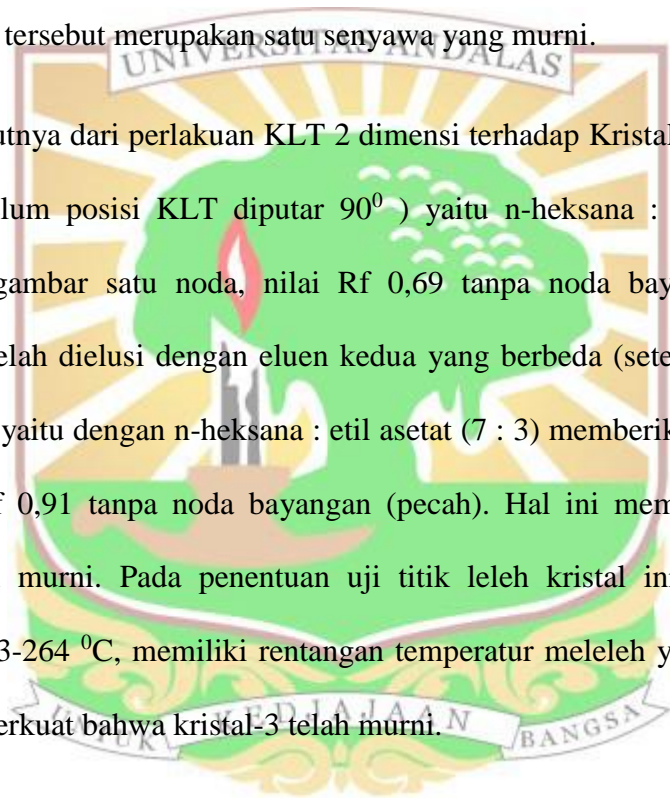
4.6. Uji Kemurnian Kristal-1

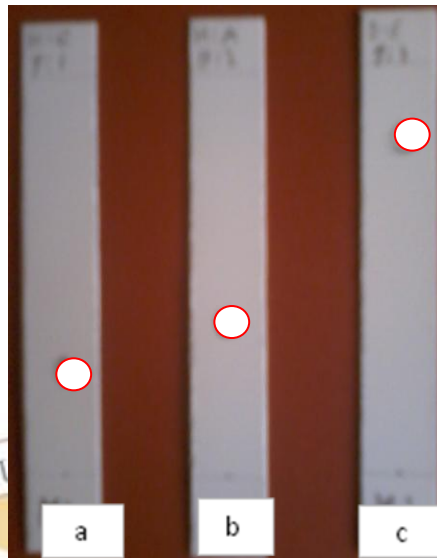
Kristal-1 berasal dari pemurnian fraksi n-heksana, berupa kristal jarum setelah direkristalisasi, berwarna putih bening, sebanyak 70,025 mg. Setelah

dilakukan uji KLT 1 dimensi dengan tiga jenis eluen yang berbeda yaitu n-heksana : etil asetat (9 : 1), n-heksana : aseton (8 : 2) dan diklorometana : etil asetat (9 : 1) memberikan satu noda dengan nilai faktor retensi (Rf) 0,34; 0,38 dan 0,82 secara berurutan, hasil ini dapat dilihat pada gambar 4.4.

Suatu elusi sampel dengan KLT 1 dimensi dengan bermacam eluen yang berbeda, jika memberikan gambar satu noda hal itu dapat memberi petunjuk bahwa sampel tersebut merupakan satu senyawa yang murni.

Selanjutnya dari perlakuan KLT 2 dimensi terhadap Kristal-1 dengan eluen pertama (sebelum posisi KLT diputar 90^0) yaitu n-heksana : aseton (7 : 3), memberikan gambar satu noda, nilai Rf 0,69 tanpa noda bayangan (pecah). Kemudian setelah dielusi dengan eluen kedua yang berbeda (setelah posisi KLT diputar 90^0), yaitu dengan n-heksana : etil asetat (7 : 3) memberikan gambar satu noda, nilai Rf 0,91 tanpa noda bayangan (pecah). Hal ini memperkuat bahwa kristal-1 telah murni. Pada penentuan uji titik leleh kristal ini meleleh pada temperatur 263-264 ^0C , memiliki rentangan temperatur meleleh yang sempit, hal ini ikut memperkuat bahwa kristal-3 telah murni.

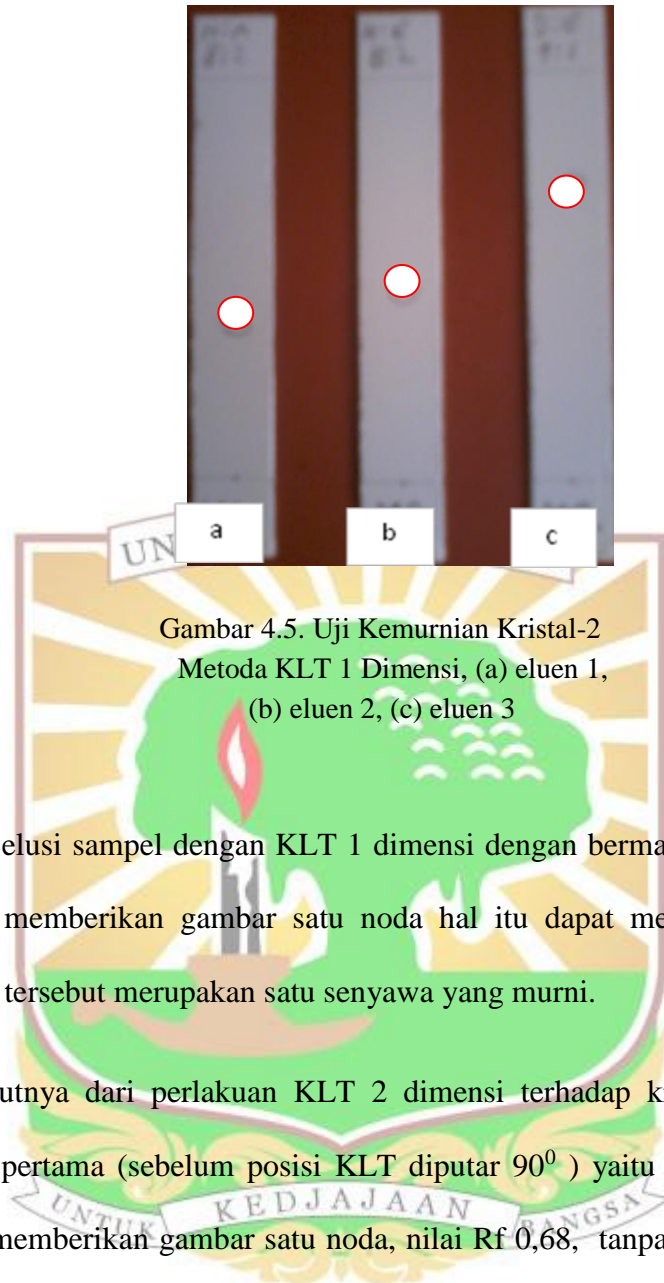




Gambar 4.4. Uji Kemurnian Kristal-1
Metoda KLT 1 Dimensi, (a) eluen 1,
(b) eluen 2, (c) eluen 3

4.7. Uji Kemurnian Kristal-2

Kristal-2 berasal dari pemurnian fraksi diklorometana, berupa amorf, berwarna putih, sebanyak 11,560 mg. Setelah dilakukan uji KLT 1 dimensi dengan tiga jenis eluen yang berbeda yaitu n-heksana : aseton (8 : 2)), n-heksana : etil asetat (8 : 2) dan diklorometana : etil asetat (9 : 1) memberikan satu noda dengan nilai faktor retensi (R_f) 0,39; 0,47 dan 0,71 secara berurutan, hasil ini dapat dilihat gambar 4.5.



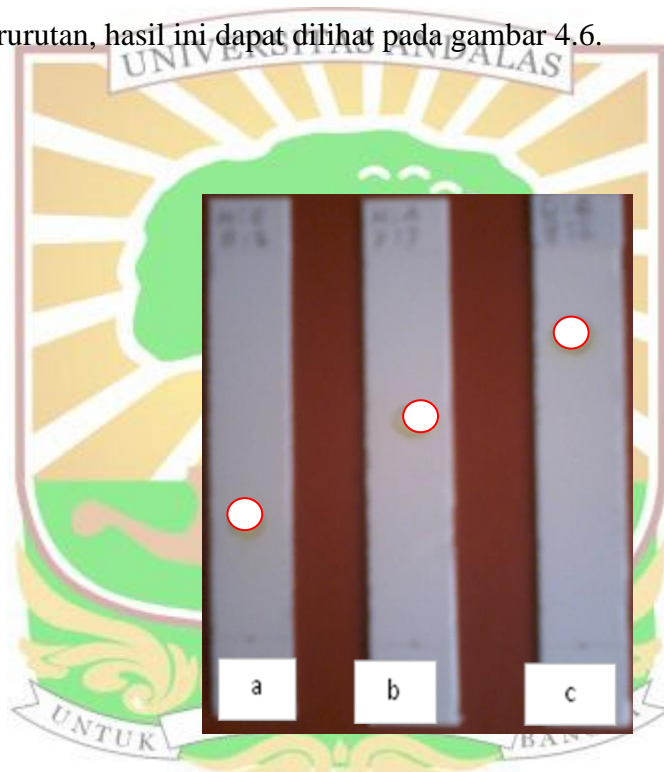
Gambar 4.5. Uji Kemurnian Kristal-2
Metoda KLT 1 Dimensi, (a) eluen 1,
(b) eluen 2, (c) eluen 3

Suatu elusi sampel dengan KLT 1 dimensi dengan bermacam eluen yang berbeda, jika memberikan gambar satu noda hal itu dapat memberi petunjuk bahwa sampel tersebut merupakan satu senyawa yang murni.

Selanjutnya dari perlakuan KLT 2 dimensi terhadap kristal NADP- 2 dengan eluen pertama (sebelum posisi KLT diputar 90^0) yaitu n-heksana : etil asetat(7 : 3) memberikan gambar satu noda, nilai Rf 0,68, tanpa noda bayangan (pecah). Kemudian setelah dielusi dengan eluen kedua yang berbeda (setelah posisi KLT diputar 90^0) yaitu dengan diklorometana : etil asetat (9 : 1)memberikan gambar satu noda, nilai Rf 0,71 tanpa noda bayangan (pecah). Hal ini memperkuat bahwa kristal NADP-2 telah murni. Pada penentuan uji titik leleh kristal ini meleleh pada temperatur 181-182 0C , memiliki rentangan temperatur meleleh yang sempit, hal ini ikut memperkuat bahwa kristal-3 telah murni.

4.8. Uji Kemurnian Kristal-3

Kristal-3 berasal dari pemurnian fraksi n-heksana, berupa kristal jarum setelah direkristalisasi, berwarna putih bening, sebanyak 10,750 mg. Setelah dilakukan uji KLT 1 dimensi dengan tiga jenis eluen yang berbeda yaitu n-heksana : etil asetat (8 : 2), n-heksana : aseton (7 : 3) dan diklorometana : etil asetat (8 : 2) memberikan satu noda dengan nilai faktor retensi (R_f) 0,30; 0,38 dan 0,78 secara berurutan, hasil ini dapat dilihat pada gambar 4.6.



Gambar 4.6.. Uji Kemurnian Kristal-3
Metoda KLT 1 Dimensi, (a) eluen 1,
(b) eluen 2, (c) eluen 3

Suatu elusi sampel dengan KLT 1 dimensi dengan bermacam eluen yang berbeda, jika memberikan gambar satu noda hal itu dapat memberi petunjuk bahwa sampel tersebut merupakan satu senyawa yang murni.

Selanjutnya dari perlakuan KLT 2 dimensi terhadap Kristal-3 dengan eluen pertama (sebelum posisi KLT diputar 90^0) yaitu n-heksana : etil asetat (6 : 4), memberikan gambar satu noda, nilai Rf 0,66 tanpa noda bayangan (pecah). Kemudian setelah dielusi dengan eluen kedua yang berbeda (setelah posisi KLT diputar 90^0) yaitu dengan diklorometana : etil asetat (8 : 2), memberikan gambar juga satu noda, nilai Rf 0,76 tanpa noda bayangan (pecah). Hal ini memperkuat bahwa Kristal-3 telah murni. Pada penentuan uji titik leleh kristal ini meleleh pada temperatur 174-175 0 C, memiliki rentangan temperatur meleleh yang sempit, hal ini ikut memperkuat bahwa kristal-3 telah murni.

4.9. Penentuan Struktur Kristal-1

4.9.1. Karakterisasi Secara Kimia dan Fisik Kristal-1

Uji karakterisasi Kristal-1 dengan pereaksi Lieberman Buchad memberikan warna biru kehijauan, ini menunjukkan bahwa kristal-1 adalah golongan steroid, memiliki kerangka siklopentanan perhidrofenantren, terdiri dari tiga cincin sikloheksaena-5-6 dan satu cincin siklopentana. Hal ini didukung ketika dilakukan penyinaran UV λ 253 dan 356 bahwa senyawa tidak memendar dan dengan pereaksi yang lain tidak bereaksi. Uji karakterisasi secara kimia dan fisik dapat dilihat pada tabel 10.

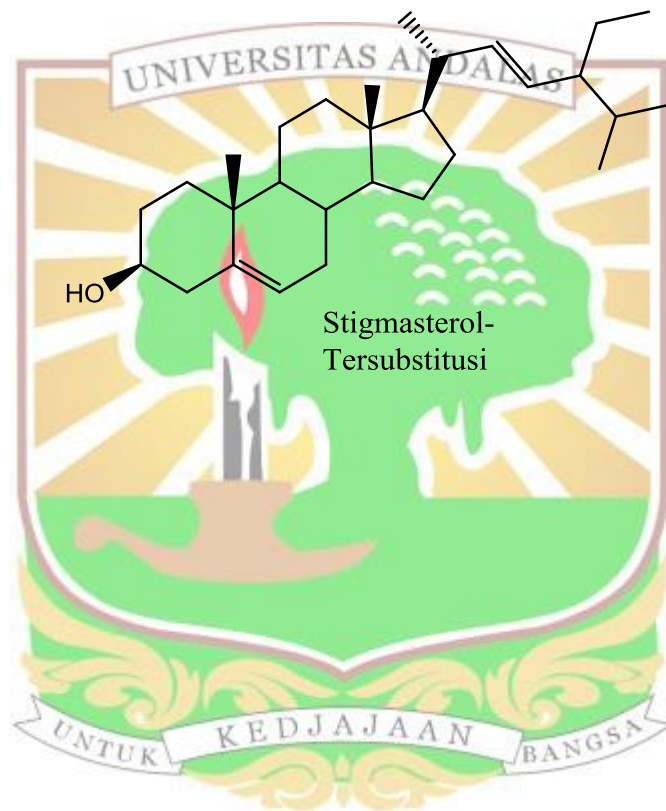
4.9.2. Karakterisasi Secara Spektroskopi Kristal-1

Data UV-Vis memberikan puncak serapan λ maksimum (nm) pada 203 dan pada 279 yang menunjukkan kristal-1 mempunyai ikatan tak jenuh (C=C) yang tidak terkonyugasi. Data IR memberikan puncak serapan pada daerah bilangan gelombang (ν, Cm^{-1}): 3429 (vibrasi ulur O-H) yang didukung oleh adanya serapan pada 1368 (vibrasi tekuk O-H). Serapan pada 2940 (vibrasi ulur C-H) dari CH₃, CH₂ dan dari CH, yang didukung oleh adanya serapan pada 1452 yang merupakan vibrasi tekuk C-H dari CH₃, CH₂ dan CH. Bilangan gelombang pada 1058 dan 885 Cm^{-1} adalah karakteristik dari sikloalkana.

Data ¹³C NMR pada δ 140,94 dan 121,91 memperkuat adanya ikatan tak jenuh (C=C) dan karakteristik untuk posisi C5-6 dari siklopentana perhidrofenantren. Geseran kimia δ pada 138,51 dan 129,46 juga menunjukkan adanya ikatan tak jenuh dari (C=C) yang lain dan karakteristik untuk posisi C23-24 pada siklopentana perhidrofenantren.. Pada δ 72,00 menunjukkan adanya (C-O) yang memperkuat adanya gugus OH dan karakteristik untuk posisi C3 pada siklopentana perhidrofenantren. Adanya dua ikatan tak jenuh pada posisi yang berbeda didukung oleh ¹H NMR yaitu munculnya δ H pada 5,3498 (m); 5,1488 (m) dan 5,0139 (s). Jenis atom karbon dari kristal ini dapat dilihat pada gambar.....

Jumlah total atom C = 41, jumlah atom C metil (CH₃) = 6, jumlah atom C metilen (CH₂) = 9 dan jumlah atom C metin (CH) = 14. Jumlah jenis atom C = 29, sisa atom C = 12 adalah sebagai substituen.

Data NMR kristal-1 dan referensi selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 10. Dari hasil perbandingan antara Kristal-1 dengan tiga stigmasterol hasil penelusuran literatur (Musa et al., 2009; Chaturvedula et al., 2012; Ferreira et al., 2014) maka Kristal-1 adalah merupakan Stigmasterol tersubstitusi.



Tabel 4.3 Data NMR Kristal-1 dan Senyawa Referensi (1, 2 dan 3)

No	¹³ C posisi	DEPT	HMQC	HMBC	[1]	[2]	[3]
1	37,45	CH ₂	1,89(2H)	C5	37,21	37.6	37.4
2	31,85	CH ₂			31,69	32.1	31.8
3	72,00	CH	3,52(3H)		71,81	72.1	71.9
4	42,49	CH ₂	2,27(2H)	C3-C5	42,35	42.4	42.4
5	140,81				140,8	141.1	140.9
6	121,62	CH	5,35(1H)	C10	121,69	121.8	121.9
7	31,56	CH ₂			31,94	31.8	32.0
8	36,34				31,94	31.8	32.0
9	50,32	CH	0,93(1H)	C7-C8	50,2	50.2	50.3
10	36,70	C			36,56	36.6	36.6
11	21,28	CH ₂			21,11	21.5	21.2
12	39,57	CH ₂	1,6(2H)		39,74	39.9	39.9
13	42,41	C			42,35	42.4	42.5
14	57,06	CH	1,08(3x1H)		56,91	56.8	56.9
15	24,49	CH ₂			24,39	24.4	24.4
16	29,11	CH ₂			28,96	29.3	28.4
17	56,14				56,06	56.2	56.2
18	12,17	CH ₃	0,68(3H)	C13-C14	12,07	12.2	12.0
19	19,59	CH ₃	1,02(3H)	C10	19,42	18.9	19.5
20	40,70				40,54	40.6	36.9
21	21,40	CH	1,50(3H)		21,11	21.7	21.2
22	138,51	CH	5,17(1H)	C20-C23	138,37	138.7	138.5
23	129,46	CH	5,04(1H)	C22	129,32	129.6	129.4
24	51,49	CH	1,53(1H)		51,29	46.1	50.3
25	32,09				31,49	29.6	31.8
26	12,45	CH ₃	0,86(3H)	C24	21,26	20.2	21.2
27	20,01			C25	19,02	19.8	18.9
28	25,60	CH ₂		C29	25,44	25.4	25.5
29	12,05	CH ₃ .	0,8(9H)	C24-C28	12,17	12.1	12.2

[1] = (Musa et al., 2009)

[2] = (Chaturvedula et al., 2012)

[3] = (Ferreira et al., 2014)

4.10. Penentuan Struktur Kristal-2

4.10.1. Karakterisasi Kristal Secara Kimia dan Fisik

Uji karakterisasi Kristal-2 dengan pereaksi Lieberman Buchad memberikan warna merah muda, ini menunjukkan bahwa Kristal-2 adalah golongan triterpenoid penta siklik. Hal ini didukung uji penyinaran dengan UV λ 263 dan 356 bahwa Kristal tidak memendar dan dengan pereaksi yang lain tidak bereaksi.

4.10.2. Karakterisasi Secara Spektroskopi

Data UV-Vis memberikan puncak serapan λ maksimum (nm) pada 301 dan 371 yang menunjukkan Kristal mempunyai ikatan tak jenuh (C=C) dan memiliki C-O dari C-OH.

Data IR memberikan puncak serapan pada daerah bilangan gelombang (ν, Cm^{-1}) 3445 (vibrasi ulur O-H) yang diperkuat oleh adanya vibrasi tekuk dari O-H pada serapan 1376. Serapan pada bilangan gelombang 2939 (vibrasi ulur C-H) dari CH₃ dan -CH₂- dan C-H yang diperkuat oleh serapan pada 1448,11 yang merupakan vibrasi tekuk dari CH₃ dan -CH₂-. Bilangan gelombang pada 1042 dan 885 adalah karakteristik sikloalkana.

Data ¹³C NMR pada δ 151 dan 110 menunjukkan adanya ikatan rangkap C=C dari C₂₀=C₂₉ dan masing-masing karakteristik untuk posisi C₂₀ dan C₂₉ pada triterpenoid penta siklik. Pada δ 78 menunjukkan adanya C-O dari C-OH yang karakteristik triterpenoid pada posisi C₃. Pada δ 56 adalah merupakan C-O yang karakteristik dari C-OH pada posisi C₂₈. Adanya ikatan tak jenuh

didukung oleh ^1H NMR yaitu munculnya δ H pada 4,71, sedangkan adanya gugus $-\text{OH}$ yang terikat didukung oleh δ H yang muncul pada 3,07. Dari data DEPT Kristal-2 didapatkan jumlah total atom C = 30 yang terdiri dari: tipe atom karbon C metil ($\text{CH}_3 = 7$), C metilen ($\text{CH}_2 = 11$, C metin ($\text{CH} = 6$) dan C kuartener = 6. Data NMR Kristal-2 dan referensi senyawa betulin selengkapnya dapat dilihat pada tabel 4.4..

Data NMR kristal-2 dan referensi senyawa betulin selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 10. Dari hasil perbandingan antara Kristal-2 dengan empat data stigmasterol hasil penelusuran literatur (Sharma et al., 2010; Ayatollahi et al., 2009; Deeb et al., 2003) maka Kristal-2 adalah merupakan senyawa Betulin.



Betulin

Tabel 4.4 Data NMR Kristal-2 dan Referensi Senyawa Betulin

No.C	DEPT	Kristal-2 13C	Betulin Otentik	Betulin [1]	Betulin [2]	Betulin [3]
1	CH2	39,57	38,6	38,87	38,69	38,9
2	CH2	21,74	18,7	20,84	27,37	27,1
3	CH2	78,56	79,8	78,98	78,96	78,9
4	C	39,07	38,6	38,72	38,86	38,9
5	CH2	56,37	55,1	55,51	55,28	54,6
6	CH2	19,14	18,1	18,31	18,28	19,6
7	CH2	35,22	34,2	33,98	34,22	35,2
8	C	39,61	41,3	40,93	40,94	40,3
9	CH2	51,49	50,2	55,37	50,3	52,1
10	C	37,99	37,1	37,32	37,14	38,2
11	CH2	28,61	20,6	27,41	20,81	19,6
12	CH2	26,41	25,4	25,22	25,19	26,9
13	CH2	37,61	37,1	37,32	37,29	36,6
14	C	41,54	42,3	42,72	42,73	42,5
15	CH2	28,31	29,8	27,06	27,03	27,1
16	CH2	31,39	30,1	29,31	29,15	29,6
17	C	43,22	47,6	45,47	47,76	48,1
18	CH2	49,98	47,5	50,41	48,75	47,7
19	CH2	47,98	47,8	48,77	47,83	47,6
20	C	151,67	149,9	150,41	150,46	157,4
21	CH2	32,87	29,9	29,76	29,73	30,1
22	CH2	37,58	34,1	34,09	33,95	34,1
23	CH3	31,08	28,6	27,99	27,96	28,7
24	CH3	16,58	15,9	15,98	15,34	15,5
25	CH3	16,15	15,2	15,36	16,09	17,1
26	CH3	16,69	16,1	16,11	15,97	17,1
27	CH3	15,04	15,1	14,77	14,74	14,8
28	CH2	56,79	60,7	60,81	60,6	60,3
29	CH2	110,07	109,4	109,51	109,67	109,5
30	CH3	19,49	20,1	19,09	19,06	19,1

[1] = (Sharma et al., 2010)

[2] = (Ayatollahi et al., 2009)

[3] = (Deeb et al., 2003)

4.11. Penentuan Struktur Kristal-3

4.11.1. Karakterisasi Secara Kimia dan Fisik

Uji karakterisasi kristal pada noda KLT memberikan warna kuning. Warna kuning yang sama juga terlihat pada penyinaran dengan UV λ 263 dan 356, dengan pereaksi yang lain tidak bereaksi.

4.11.2. Karakterisasi Secara Spektroskopi

Pita serapan λ maks muncul pada 207,4 karakteristik untuk aromatis (dan pada . 247,4 (π - π^* aromatis). 297,8 (n - π^* karbonil lakton). 3536,4 (C-H ulur)/ 3374,6 (C-H ulur aromatis)/ 1630,12 (C=O lakton konyugasi)/1448,52 (C-H tekuk metil). 1229,21 (C-O ulur lakton).1156,18 (C-O ulur siklis).749,76 (C-H tekuk benzen).

Dari data NMR dapat dijelaskan sebagai berikut:

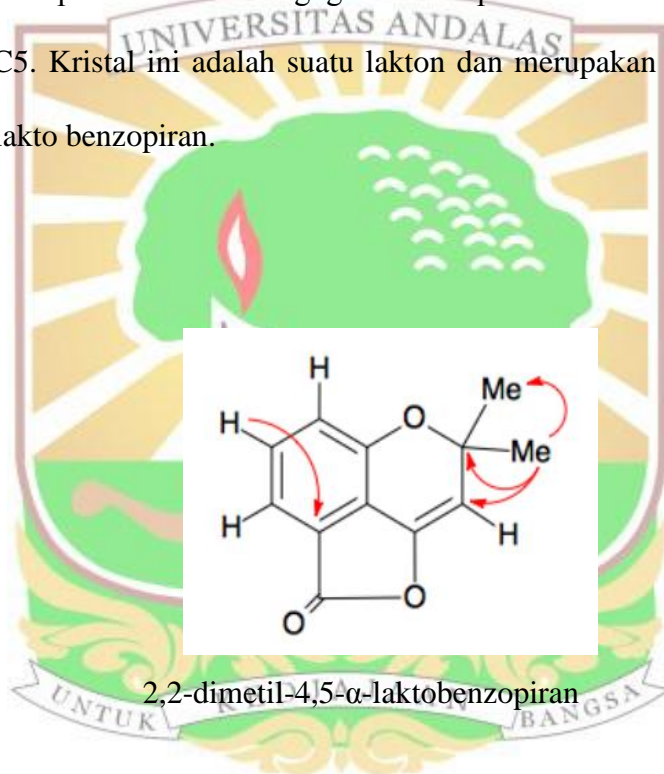
- 1). Senyawa terindikasi turunan benzen trisubstitusi-1,2,3.
- 2). Gugus dimetil diharapkan menunjukkan hubungan hanya untuk karbon Metin di 102,17 ppm dan oksigen-bantalan karbon kurtener di sekitar 60 ppm.
- 3). Diasumsikan sejumlah korelasi hilang , ini hanya dimungkinkan hadir unit (m-O-CMe₂-CH=C)
- 4). Untuk menjelaskan geseran kimia 102,17 pp (ditugaskan untuk karbon olefin metin, karbon kuartener olefin harus diganti dengan oksigen dan karbon,
- 5). Juga mempertimbangkan aturan biogenetik isoprena, ada kemungkinan

cicin benzen adalah diganti denganbenzen karbon-C-(O-m)=CH-CMe2-O- karbon benzen lainnya.

- 6). Atom oksigen yang unik bisa menjadi semacam bentuk enol dan enolik OH harus bergabung untuk membentuk ester atau lakton, unit tersebut merupakan substituen terakhir yang dimiliki cincin benzen setidaknya satu karbon.

Data NMR Kristal-3 selengkapnya dapat dilihat pada tabel 4.5.

atau turunan benzopiran tersubstitusi gugus dimetil pada C2 dan α -lakton pada C4 dan C5. Kristal ini adalah suatu lakton dan merupakan senyawa 2,2-dimetil-4,5- α -lakto benzopiran.



Tabel 4.5. Data NMR Kristal-3

No. C	δC	DEPT	HMQC	HMBC	COSY
2	54	C			
3	102,67	CH	6,8736(1H,s)		
4	170,66	C			
4a	134,08	C			
5	121,3	C			H7-H8
6	125,52	CH	7,7616 (1H,t,7,8)		
7	137,44	CH	7,3151 (1H)		
8	120,17	CH	7,71(1H,dd,1,3;8,0)		H8-H7
8a	123,74	C			
9 & 10	29,244	2xCH ₃	1,5346 (6H)	C9/C10	
11	173,08	C			

4.12. Hasil Uji Bioaktivitas Kristal-1, Kristal-2 dan Kristal-3

Hasil uji antikanker dari kristal dapat dilihat pada tabel 4.6, hasil uji antibakteri pada tabel 4.7 dan hasil uji antijamur pada tabel 4.8.

Tabel 4.6. Nilai IC₅₀ Uji Antikanker Kristal-1, Kristal-2 dan Kristal-3 Terhadap Sel Murine Leukemia P 388 Metoda MTT

	Kristal-1	Kristal-2	Kristal-3	Kontrol (+)
IC ₅₀	63,3317	8,4995	1,489	1,3601

Tabel 4.7. Hasil Uji Antibakteri Kristal-1, Kristal-2, Kristal-3 Metode Resazurin Microtiter Assay (REMA)

Bakteri	Kosentrasi hambat Minimum (KHM) ug/mL			
	Kristal-1	Kristal-2	Kristal-3	Cefadroxil
<i>Escheria Coli</i> (Gram negatif)	1,25	0,625	0,1563	0,1563
<i>Pseudomona Aeroginosa</i> (Gram negatif)	0,625	0,3125	0,3125	0,1563
<i>Staphylococcus Aureus</i> (Grma positif)	0,3125	0,625	0,1563	0,1563
<i>Basillus Subtilis</i> (Gram positif)	2,5	0,625	0,3126	0,1563

Cefadroxil = Kontrol (+)

Tabel 4.8. Uji Antijamur Kristal-1, Kristal-2, Kristal-3 dengan Metode Resazurin Microtiter Assay (REMA)

Jamur	Kosentrasi hambat Minimum (KHM) ug/mL			
	Kristal-1	Kristal-2	Kristal-3	<i>Ketoconazole</i>
<i>Aspergillus niger</i>	5	2,5	0,3125	0,625
<i>Tricophyton mentagrophytes</i>	2,5	1,25	0,3125	0,625
<i>Candida albicans</i>	5	1,25	0,625	0,625
<i>Epidermo floccosum</i>	10	2,5	0,625	0,625

Ketoconazole = kontrol (+)

Hasil uji bioaktivitas Kristal-1, Kristal-2 dan Kristal-3 terhadap uji antikanker, antibakteri dan antijamur dapat dikatakan bahwa aktifitas Kristal-3 lebih aktif dari Kristal-2 dan Kristal-2 lebih aktif dari Kristal-1. Perbedaan keaktifan tersebut dapat dijelaskan pertama berdasarkan perbedaan struktur kristal terutama ditinjau dari gugus (-O-) atau (-OH): Kristal-3 memiliki gugus fungsi (aktif) sebanyak 3 gugus yaitu 2 oksigen dari laktone dan 1 oksigen dari piran; sedangkan Kristal-2 memiliki 2 gugus fungsi -OH dan ada tambahan 1

ikatan takjenuh (-C=C-); sedangkan Kristal-3 memiliki 1 gugus -OH dan tambahan 2 ikatan takjenuh (-C=C-), (Williamson, 1994).

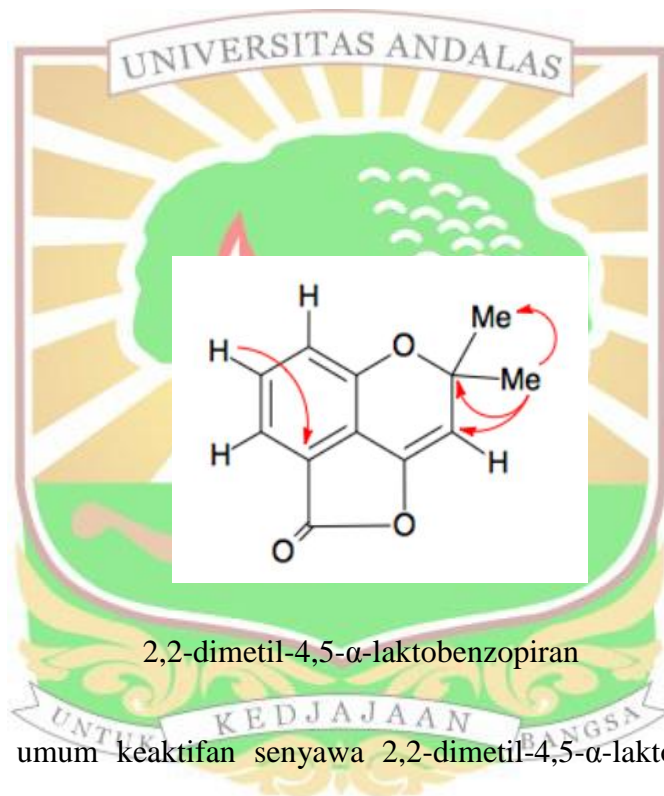
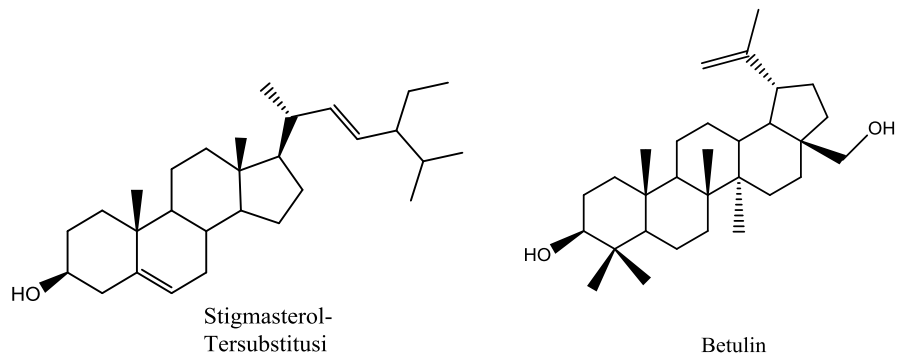
Kedua dapat dijelaskan berdasarkan perbedaan kepolaran: Semakin banyak gugus hidrofilik (-O- dan -OH) yang dimiliki kristal maka semakin polar kristal tersebut dan mudah larut dalam air. Dalam hal ini Kristal-3 lebih polar dari Kristal-2 dan Kristal-2 lebih polar dari Kristal-1. Media yang digunakan pada uji Antimikroba tersebut adalah bersifat polar demikian juga cairan dalam sel uji adalah bersifat polar. Oleh karena itu interaksi Kristal dengan sel uji akan lebih besar bagi kristal yang lebih polar (Cerey, 2000).



BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

1. Tiga senyawa telah diisolasi dari kulit batang *Callicarpa arborea* Roxb, masing-masing Kristal-1 sebanyak 70,025 mg berupa amorf putih, Kristal-2 11,560 mg berupa amorf putih dan Kristal-3 10,750 mg berupa amorf kuning. Berdasarkan spektroskopi IR, UV-Vis dan NMR 1 dan 2 dimensi maka Kristal-1 adalah Stigmasteroltersubstitusi, Kristal-2 adalah Betulin dan Kristal-3 adalah 2,2-dimetil-4,5- α -laktobenzopiran. Dari penelusuran literatur menunjukkan bahwa ketiga senyawa tersebut adalah baru dari spesiesnya. Khusus senyawa 2,2-dimetil-4,5- α -laktobenzopiran berdasarkan penelusuran literatur adalah merupakan senyawa baru dari organisme apapun juga.



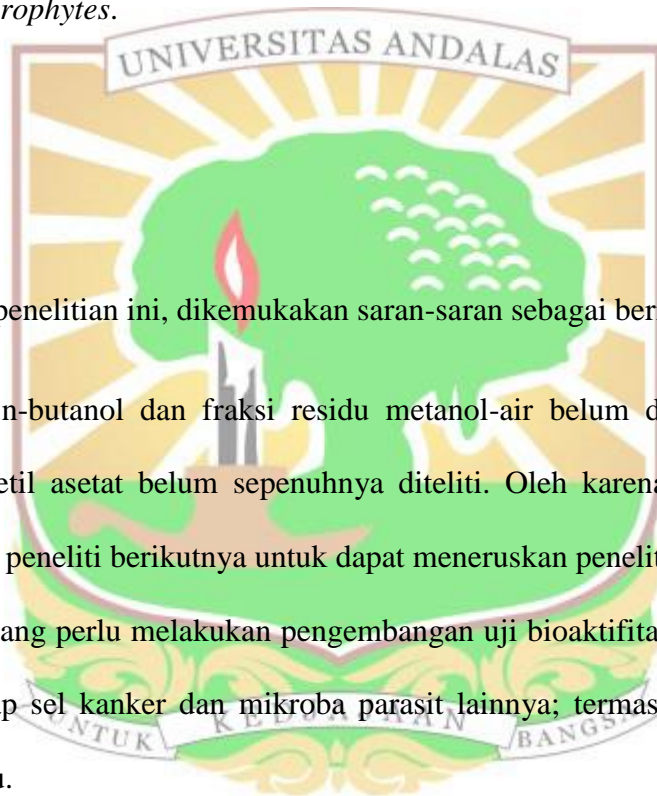
2. Secara umum keaktifan senyawa 2,2-dimetil-4,5- α -laktobenzopiran > betulin > stigmasterol terhadap semua uji (uji antikanker sel Murine Leukimia P 388, antibakteri dan antijamur).
3. Pada uji antibakteri senyawa isolat memberikan hasil sebagai berikut:
 - a. Keaktifan senyawa 2,2-dimetil-4,5- α -laktobenzopiran dan betulin adalah sama > stigmasteroltersubstitusi terhadap uji antibakteri *P. Aeruginosa* (Gram negatif).

- b. Keaktifan senyawa 2,2-dimetil-4,5- α -lakto benzopiran sama dengan keaktifan senyawa kontrol positif (cefadroxil) terhadap uji antijamur *E. Coli* (Gram negatif) dan *Staphylococcus aureus* (Gram positif).
4. Keaktifan senyawa 2,2-dimetil-4,5- α -laktobenzopiran > senyawa kontrol positif (ketoconazole) terhadap jamur *Aspergillus niger* dan *Tricophyton mentagrophytes*.

5.2. Saran

Dari kegiatan penelitian ini, dikemukakan saran-saran sebagai berikut:

1. Fraksi n-butanol dan fraksi residu metanol-air belum diteliti, termasuk fraksi etil asetat belum sepenuhnya diteliti. Oleh karena itu disarankan kepada peneliti berikutnya untuk dapat meneruskan penelitian ini.
2. Dipandang perlu melakukan pengembangan uji bioaktifitas senyawa isolat terhadap sel kanker dan mikroba parasit lainnya; termasuk untuk tujuan tertentu.





Achmad, S.A., Bahan Alam untuk Mendukung Pengembangan Bioindustri. Makalah pada Seminar Nasional Kimia Bahan Alam Unair dan Ikahimki pada 4 September 2004. Surabaya, 2004.

Amin, M.. Senyawa Turunan Flavan-3-ol dari Kulit Akar *Artocarpus nitida* Trec, (Thesis), IT. Bandung, 1997.

Anaya, A.L., Mata, R., Sims, J.J., Coloma, A.G., Ortega, R.C., Guadano, A., Bautista, B.E.A., Midland, S.L., Rios, G. dan Pompa, A.G. 2003. Allelochemical Potential of *Callicarpa acuminata*. *J Chem Ecol.*, Vol. 29, No. 12. Pp: 2761-2775.

Anh Nguyen, Yen Phan, Preliminary phytochemical analysis of different solvent extracts of *Derris elliptica* (Roxb.) Benth leaves. *International Journal of Innovative and Applied Research*, Vol 2, Issue (12), 74 – 76, 2014.

- Anjaneyulu, A.S.R., Lakshminarayana, V. dan Row, L.R. 1977. Isolation Maslinic Acid From *Callicarpa arborea* Roxb. Letters to The Editor, Vol. 46, No.19, pp 667-668.
- Ayatollahi, S. A., Shojaii, A., Kobarfard, F., Nori, M., Fathi, M., Choudhari, M. I., Terpens from aerial parts of *Euphorbia splendida*. *JMPR*, 3 (9), 660-665, 2009.
- Baia, T., Yanga, Y., , Yaoa, Y. L., Sunc, P., Liana, L. H., Wua, Y. L., , Nana, J. X., Betulin alleviated ethanol-induced alcoholic liver injury via SIRT1/AMPK signaling pathway. *Pharmacological Research*, 105, 1–12, 2016.
- Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium Dyes as Tools in Cell Biology: New Insights Into Their Cellular Reduction. *Biotechnology Annual Review, Elsevier*, 11, 127-152, 2005.
- Bhangu-Uhlmann, A., The Mevalonate Pathway: A monitoring approach in plants by systems biology tools (Disertasi), Dipl. Biol., Technische Universität München, born, 1979.
- Bohlmann J, Meyer-Gauen, G., Croteau, R., Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95(8), 4126-4133, 1998.
- Bokhtear, S.U. 2011 Medicinal Plants of Bangladesh. <http://www.mpbd.info/plants/callicarpa-tomentosa.php>. 22 Mater 2012. 11.50 AM.
- Breitmaier, E., Terpenes: Importance, General Structure, and Biosynthesis, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, ISBN: 3-527-31786-4, 2006.

Breitmaier, E. 2002. Structure Elucidation by NMR in Organic Chemistry: Practical Guide, John Wiley & Son, LTD. Chichester. Hal: 11-67.

Bretmajer, E. 2006. Terpen: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Weinheim. Hal: 1-9.

Cantrell, C.L., Klun, J.A., Bryson, C.T., Kobaysi, M. dan Duke, S.O. Isolation and Identification of Mosquito Bite Deterrent Terpenoids from Leaves of American (*Callicarpa americana*) and Japanese (*Callicarpa japonica*) Beautyberry. *J. Agrig. Food Chem.*, 53 (15), 5948-5953, 2005.

Cerey, F. A., Organic Chemistry, McGraw-Hill Companies, Inc., 4th ed., 208-654, 2000.

Chaturvedula, V. S. P., Prakash, I., Isolation of Stigmasterol and β -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. *International Current Pharmaceutical Journal*, 1 (9): 239-242, 2012

Chen, J. J., Huang, S. Y., Duh, C. Y., Chen, I. S., Wang, T. C., Fang, H. Y., Article: A New Cytotoxic Amide from the Stem Wood of *Hibiscus tiliaceus*. *Planta Medica*, 72 (10), 935-938, 2006.

Chen, J.J., Hu, H-M., Peng, C-F., Chen, I-S., Chu, S-D. Seco-Abietane Diterpenoids, A Phenyletanoid Derivative, and Antitubercular Constituents from *Callicarpa pilosissima*. *J. Nat. Prod.*, 72 (2), 223-228, 2009.

Chen, R.S., Lai, J.S., Wu, T-S., Studies on Constituents on *Callicarpa Formosa* ROLFE. *J. Chin. Soc.*, 33, 329-334, 1986.

Deeb, K. S. E., Haidari, R. A. A., Mossa, J. S., Ateya, A. M., Phytochemical and Pharmacological Studies of *Maytenus Forsskaoliana*. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 11 (4), 184-191, 2003.

- Donadio, S. and Sosio, M., Antibiotics: Targets, Mechanisms and Resistance: Inhibitors of Cell-Wall Synthesis, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Chap 6, (pages 133-146), 2014.
- Fabris, M., Matthijs, M., Carbonelle, S., Moses, Pollier, T. J., Dasseville, R., Baart, G. J. E., Vyverman, W., Goossens, A., Tracking the sterol biosynthesis pathway of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *New Phytol.*, 204 (3), 521–535, 2014.
- Falodun, A., Engel, N., Kragl, U., Nebe, B., Langer, P., Novel anticancer alkene lactone from *Persea Americana*. *Pharm Biol.*, 51 (6), 700-706, 2013.
- Ferreira, E. L. F., Mascarenhas, T. S., Oliveira, J. P. C., Phytochemical investigation and antioxidant activity of extracts of *Lecythis pisonis* Camb. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8 (8), 353-360, 2014.
- Ferrai, M., Fornasiero, M. C., Isetta, A. M., MTT Colorimetric Assay for Testing Macrophage Cytotoxic Activity in Vitro. *J. Immunol. Methods.*, 131, 165-172, 1990.
- Freiesleben, S.H. and Jäger, A.K., Correlation between Plant Secondary Metabolites and Their Antifungal Mechanisms ? A Review, *Med Aromat Plants* 3: 154, 2014.
- Gerlier, D., Thomasset, N., Use of MTT Colorimetric Assay to Measure Cell Activation. *J. Immunol. Methods.*, 94 (1–2), 57-63, 1986.
- Ghimire, G. P., Thuan, N. H., Koirala, N., Sohng, J. K., Advances in Biochemistry and Microbial Production of Squalene and Its Derivatives. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 26 (3), 441-451, 2016.
- Grotewold, E. (2006). *The Science of Flavonoids*. Springer. Ohio. Hal: 1-46 , 71-96. Vogt, T. (2010). *Phenylpropanoid Biosynthesis*. *Molekular Plant*. Volume 3. pp (220).

- García, V. M. N., Herrera, J. L., Bribiesca, Ma. G. R., Fitz, P. A., Ríos, M. Y.,
*Article:Antibacterial Activity of Aristolochia brevipes against Multidrug-
Resistant Mycobacterium tuberculosis. Molecules, 16 (9), 7357-7364,
2011.*
- Guadarrama, A., Berenice, Navarro, Víctor, León-Rivera, L., Ismael and Rios,
María Yolanda, M., Yolanda, Active compounds against tinea pedis
dermatophytes from *Ageratina pichinchensis* var. *Bustamenta. Nat. Prod.
Res., 23 (16), 1559-1565, 2009.*
- Hansons, J.R. 2005. Natural Products: The Secondary Metabolites. Royal Society
of Chemistry.
- Harborn, J.B., Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis
Tumbuhan,(Padmawinata,K., Soediro,I, Terjemahan), Penerbit ITB
Bandung, 1996.
- Hasratman. 2007. Penentuan Aktifitas Antioksidan. [http://Julhasratman.
blogspot.com](http://Julhasratman.blogspot.com). 2007/09/Makalah Literatur Seminar Literatur-jld-3,html. 22
Maret 2012, 10.35 AM.
- Henry, L. K., Gutensohn, M., Thomasc, M. S. T., Noelc, J. P., Dudarevaa, N.,
Orthologs of the archaeal isopentenyl phosphate kinase regulate terpenoid
production in plants. *PNAS.*, 112 (32), 10050–10055, 2015.
- Ivanescu, B., Miron, A., Corciova, A., Review Article, Sesquiterpene Lactones
from *Artemisia Genus*: Biological Activities and Methods of Analysis,
Journal of Analytical Methods in Chemistry, Article ID 247685, 21
halaman, 2015.
- Jamir, N.S. and Rao, R.S. 1990. Fifty New or Interresting Medicinal Plants Used
by Zealangs from Nagaland, India. *Ethnobotani*, 2 (1 & 2), 11-18, 2007.

- Jone, W., Kinghorn, A.D. 2008. Biologically Active Natural Products of the Genus *Callicarpa*. *Curr Bioact Compd.*, 4(1), 15-32, 2008.
- Jones, W. P. Lobo, T. E., Mi, Q., Chai, H. B., Soejarto, D. D., Cordell, G. A., Swanson, S. M., A. D., Cytotoxic Constituents from the Fruiting Branches of *Callicarpa Americana* Collected in Southern Florida. *J. Nat. Prod.*, 70 (3), 372-373, 2007.
- Koo, K.A., Sung, S.H., Park, J.H., Kim, S.H., Li, K.Y., Kim, Y.C. In Vitro Neuroprotective Activities of Phenyletanoid Glycosides from *Callicarpa dichotoma*. *Plant Med.*, 71 (8), 778-780, 2005.
- Koo, K.H., Kim, S.H., Oh, T.H. dan Kim, Y.C. Acteoside and its Aglycones Protect Primary Cultures of Rat Cortical cells from Glutamate-Induced Excitotoxicity. *Life Sciences*, 79 (7), 709-716, 2006.
- Kuljarachanan, T., Devahastin, S., Chiewchan, N. Evolution of Antioxidant Compounds in Lime Residues During Drying. *Food Chemistry*. 113, 944-949, 2009.
- Lambert, J.B., Shurvell, H.F., Lihtgner, D.A., Cooks, R.G. 1998. Organic Structural Spectroskopi. Prencetis-Hall, Inc. New Jersey. Hal: 202-394.
- Lee, K.Y., Jeong, E.J., Lee, H.S. dan Kim, Y.C. Acteoside of *Callicarpa dichotoma* Attenuates Scopolamine-Induced Memory Impairments. *Biol. Pharm. Bull.*, 29(1) 71-74, 2006.
- Lin, C-Z., Zhu, C-C., Zhao, Z-X., Li, X-H., Xiong, T-Q., Xia, Y.Y and Ning, Y. Two New Abietane Diterpenoids from The Caulis and Leaves of *Callicarpa kochiana*. *Fitoterapia*, 83 (3), 1-5, 2011.
- Liu, H.Y., He, H-P. Gau, S., Chen, C-Y., Shen, Y-M. and Hao, X-J. Two New Diterpenoid from *Callicarpa pedunculata*. *Helvetica Chimica Acta*, 89 (5), 1017-1022, 2006.

- Lu, Y. dan Hua, Y. Abietane Diterpen from *Callicarpa pedunculata*. *Natural Product Research and Development*, 23 (1), 66-68, 2011.
- Manjang Y. Workshop Peningkatan Sumber Daya Manusia dan Penelitian Potensi Keanekaragaman Hayat, Universitas Andalas 2006.
- Mazid, M., Khan, T. A., Mohammad, F., Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine*, 3 (2) Special Issue: 232-249, 2011.
- Mesquita , M. L. D., Paula, J.E. D., Pessoa, C., Moraes, M. O. D., Lotufo, L. V. C., Grougnet , R., Michel, S., Fran, Tillequin, O., Espindola, L. S., , Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants Used in Traditional Medicine Against Cancer Cell Lines. *J. Ethnopharmacol.*, 123 (3), 439-445, 2009.
- Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65 (1-2), 55-63, 1983.
- Musa, W., Hersanti, Zainuddin, A., Tjokronegoro, R., The Poriferasta Compound- 5,22E,25-Trien-3-O β from *Clerodendrum paniculatum* Leaf as Inducer Agent of Systemic Resistance on Red Chilli Plant *Capsicum annum L* from *Cucumber Mosaic Virus* (CMV). *Indo. J. Chem.*, 9 (3), 479-486, 2009.
- Nes, W. D., Biosynthesis of Cholesterol and Other Sterols. *Chem. Rev.*, 111 (10), 6423–6451, 2011.
- Nes, W. D., Zhou, W., Terpenoids: Higher, *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*, Nature Publishing Group, www.els.net 13, 2001.
- Nour, M. S., El-Shokry, M. H. , Shehata, I. H., Aziz AM, A. E., Evaluation of rezasurin microtiter assay and high resolution melting curve analysis for

detection of rifampicin and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates,. *Clin. Lab.*, 59(7-8), 763-771, 2013.

Patel, S., Gheewala\$, N., Suthar, A., Shah, A, In-Vitro Cytotoxicity Activity of Solanum Nigrum Extract, Against *Hela* Cell Line And *Vero* Cell Line. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 1 (1), 38-46, 2009.

Palomino, J., C., Martin, A., Camacho, M., Guerra, H., Swings, J., Portaels, F., Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 46(8), 2720–2722, 2002.

Pereira, F.DO., Mendes,J.M., Lima,I.O., Mota,K.S.D.L., Oliveira, W.A.D., Lima,E.D.O., Pharmaceutical Biology: Antifungal activity of geraniol and citronellol, two Monoterpenes alcohols, againts *Trichophyton rubrum* involves in hibition of ergosterol Biosynthesis, 53 (2), 2015.

Ragasa, C. Y., Alea, G. V., Rideout, J. A., An Antifungal Sesquiterpene Lactone from *Pseudoelephantopus spicatus*, *OL*, 2 (2), 1999.

Riss, T. L., , Moravec, R. A., , Niles, A. L., , Benink, H. A., , Worzella, T. J., Lisa Minor, L., Cell Viability Assays, Assay Guidance Manual [Internet]. (Sittampalam GS, Coussens NP, Nelson H, et al., editors), 1-23, 2015.

Rollins,D.M. and Joseph,S.W., Basic Mechanisms of Antibiotic Action and Resistance: Five Basic Mechanisms of Antibiotic Action against Bacterial Cells, University of Maryland, 2000.

Rzeski, W., Stepulak, A., Szymański, M., Juszcak, M., Grabarska, A., A , Sifringer, (M) , Kaczor J. K., , Kandefer-Szerszeń, M. K., Betulin elicits anti-cancer effects in tumour primary cultures and cell lines in vitro. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 105(6), 425-432, 2009.

- Salvador, J. A. R., Silvestre, S. M., and Rui M. A. Pinto, R. M. A., Bismuth(III) Reagents in Steroid and Terpene Chemistry. *Molecules*, 16, 2884-2913, 2011.
- Santoni, Anton. Elusidasi Struktur Flavonoid, Triterpenoid dari Kulit Batang Surian (*Toona sinensis*) Serta Uji Aktivitas. Disertasi FMIPA UNAND, 2009.
- Saravanan, B. C., Sreekumar, C., Bansal, G. C., Raya, D., RAO, J. R., , Mishra, A. K., A rapid MTT colorimetric assay to assess the proliferative index of two Indian strains of *Theileria annulata*. *Vet. Parasitol.*, 113, 211–216, 2003.
- Saroglou, Karioti, A., Rancic, A., Dimas, K., Koukoulitsa, C., Zervou, M., H. Sesquiterpene Lactones from *Anthemis melanolepis* and Their Antibacterial and Cytotoxic Activities. Prediction of Their Pharmacokinetic Profile. *J. Nat. Prod.*, 73 (2), 242–246, 2010.
- Schreiner, M., Mewis, I., Huyskensl, S. K., Jansen, M. A. K., Zrenner, R., Winkler, R. J. B., Brien, N. O., Krumbein, A., Original Articles, UV-B-Induced Secondary Plant Metabolites - Potential Benefits for Plant and Human Health. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31 (3), 229-240, 2012.
- Sharma, A.K., Negi, K.S., Bandari, J.C., Shukla, H.Y., Pareek, S.K. Influence of NPK and Spasings on The Growth and Yield of Herbage of *Callicarpa macrophylla* Vahl Priyangoo. ENVIS Buletin vol 12(1), 2000.
- Sharma, P. P., , Roy, R. K. B, Anurag, Gupta, D., Pentacyclic Triterpinoids from *Betula utilis* and *Hyptis suaveolens*. *IJPTR*, 2 (2), 1558-1532, 2010.
- Singh, A.K., Agpawal, P.K. 1994. 17-isoprophylidane, a Diterpenoid from *Callicarpa macrophylla*. *Phytochemistry volume 37,2*, pp 587-588.
- Suryavanshi, V. R., Resazurin microtitre assay (REMA) for Antibacterial and Antifungal Activity of Herbs of Three Antidiarrhoeal Formulations:

Bilagyl and Berbenterone Tablets and Berbenterone Suspension, Department of Pharmaceutical Analysis, Bombay College of Pharmacy, Kalina, Mumbai, <http://pharmacognosy-phytochemistry-natural-products.pharmaceuticalconferences.com/speaker-pdfs/2015/vipul-suryavanshi-bombay-college-of-pharmacy-india.pdf/2-4-2016>.

Sylvester, P. W., Optimization of The Tetrazolium Dye (Mtt) Colorimetric Assay for Cellular Growth and Viability, Drug Design And Discovery (Editor: Seetharama D. Satyanarayanajois) Volume 716 Of The Series Methods In Molecular Biology Pp 157-168, Doi 10.1007/978-1-61779-012-6, 2011.

Soekamto, N.H. 2010. Menentukan Struktur Molekul Senyawa Melalui Analisis Data Spektroskopi. FMIPA Universitas Hasanuddin.

Umachandur, Ganga Rao, B. T., Kalyani A, Devarakonda, R., Evaluation of the Anti-Bacterial and Anti-Fungal Activity of *Callicarpa arborea* Leaves, *RJPBCS*, 6 (1), Page No. 1500, 2015.

Umubyeyi, A. N., Martin, A., Zissis, G., Struelens, M., Karita, E., Portaels, F., Evaluation of the resazurin microtiter assay for rapid detection of ofloxacin resistance in *M. Tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis.*, 10(7), 808–811, 2006.

Vranová, E., Coman, D., Gruissem, W., Network Analysis of the MVA and MEP Pathways for Isoprenoid Synthesis. *Annu Rev Plant Biol.*, 64, 665-700, 2013.

Wentzinger, L. F., Bach, T. J., Hartmann, M-A, Inhibition of Squalene Synthase and Squalene Epoxidase in Tobacco Cells Triggers an Up-Regulation of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase. *Plant Physiol.*, 130(1), 334–346, 2002.

- Williamson, K. J., *Macroscale and Microscale Organic Experiments* Lexington, Massachusetts: D. C, 2nd ed., p. 40, 1994.
- Wixon, R.L., Gehrke, C.W. 2010. *Chromatography A Science Discovery*. John Wiley & Sons. New Jersey.
- Xie, E.L., Zhou, G.P., Ji, T.F., Wu, J. dan Yuan, G.P. 2009. A Novel Phenylpropanoid Glycoside from *Callicarpa Kwangtungensis* Chun. *Chinese Chemical Letters* 20. 827-829 Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1989. *Materia Medika Indonesia*. Jakarta. Jilid VI
- Xu, J., Harrison, L-J., Vital, J.J., Goh, S-H. Four New Clerodane Diterpenoid from *Callicarpa pentandar*. *J. Nat. Prod.*, 63 (8), 1062-1065, 2000.
- Yamasaki, T., Mashoka, C., Nohara, T., dan Ono, M. A New Phenylethanoid Glycoside From The Fruits of *Callicarpa japonica* Thunb. var. *luxurans* Rehd. *J. Nat. Med.*, 61 (3), 318-322, 2007.
- Zhang, Y. Seeram, N.P., Lee, R., Feng, L., Heber, D. Isolation and identification of Strawberry Phenolics with Antioxidant and Human Cancer Cell Antiproliferative Properties. *J. Agric. Food Chem.*, 56(3), 670-675, 2008.
- Zhao, S., Park, C. H., Li, X., Kim, Y. B., Yang, J., Sung, G. B., Park, N. I. I., Kim, S., Park, S. U., Article: Accumulation of Rutin and Betulinic Acid and Expression of Phenylpropanoid and Triterpenoid Biosynthetic Genes in Mulberry (*Morus alba* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 63 (38), 8622–8630, 2015.
- Zhuang, X., Chappell, J., *Engineering Novel Terpene Production Platforms in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae** (Disertasi), University of Kentucky, 2013.

LAMPIRAN



Lampiran 1



HERBARIUM UNIVERSITAS ANDALAS (ANDA)

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas Kampus Limau Manih Padang Sumbar
Indonesia 25163 Telp. +62-751-777427 ext. *811 e-mail: nas_herb@yahoo.com

Nomor : 106/K-ID/ANDA/VI/2012
Lampiran : -
Perihal : Hasil Identifikasi

Kepada Yth,
M. Amin, M.Si
Di
Padang

Dengan hormat,
Sehubungan dengan surat anda mengenai bantuan untuk "Identifikasi Tumbuhan" di
Herbarium Universitas Andalas Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas, kami telah
membantu mengidentifikasi tumbuhan yang anda bawa, atas nama:

Nama : M.Amin, M.Si
Instansi : Pasca Sarjana UNAND

Berikut ini diberikan hasil identifikasi specimen yang dikeluarkan dari Herbarium
Universitas Andalas.

No	Famili	Spesies
1	Poaceae	<i>Saccharum spontaneum</i> Linn.
2	Verbenaceae	<i>Callicarpa arborea</i> Roxb.

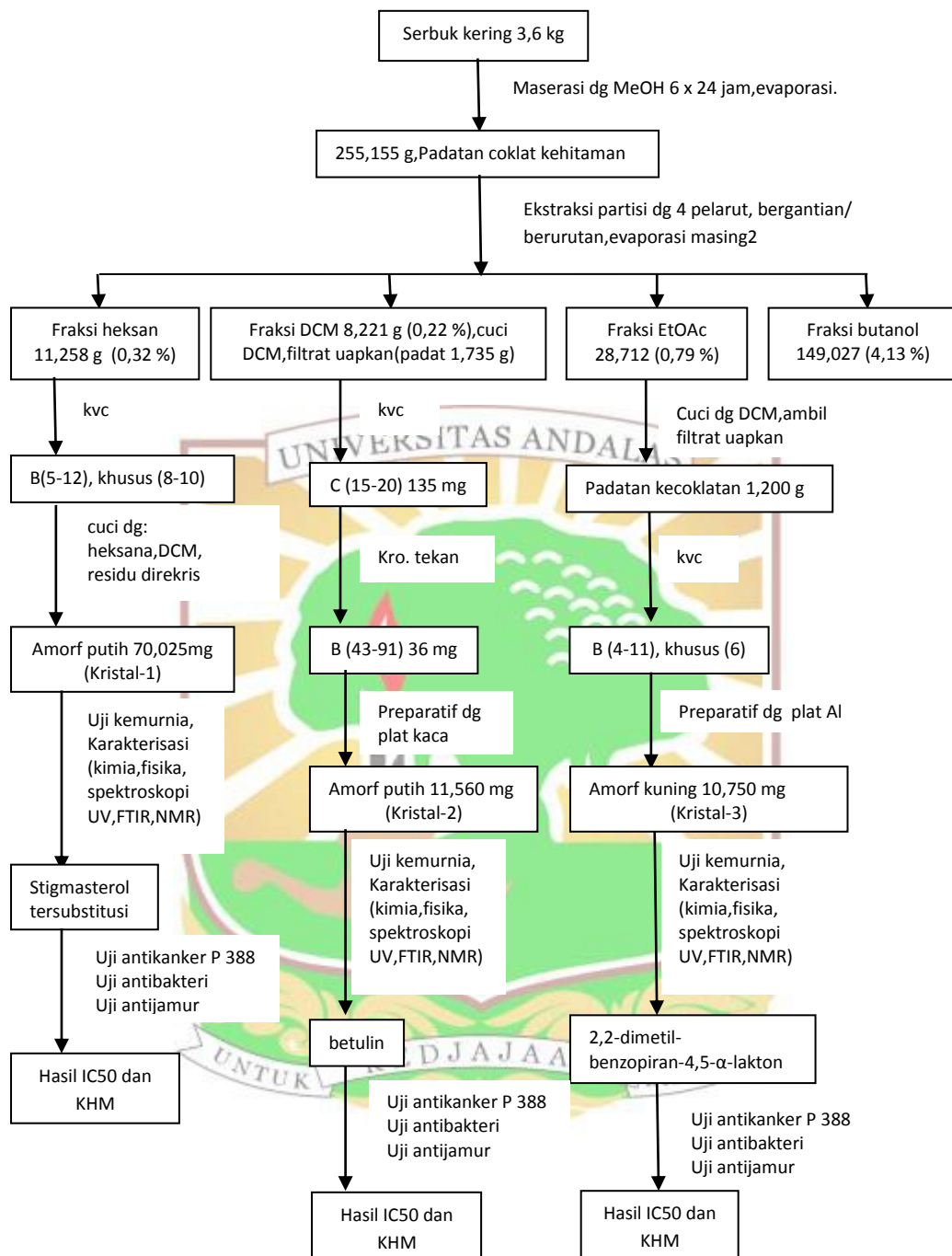
Demikian surat ini dibuat untuk dapat digunakan seperlunya.

Padang, 22 Juni 2012

dan Kepala,

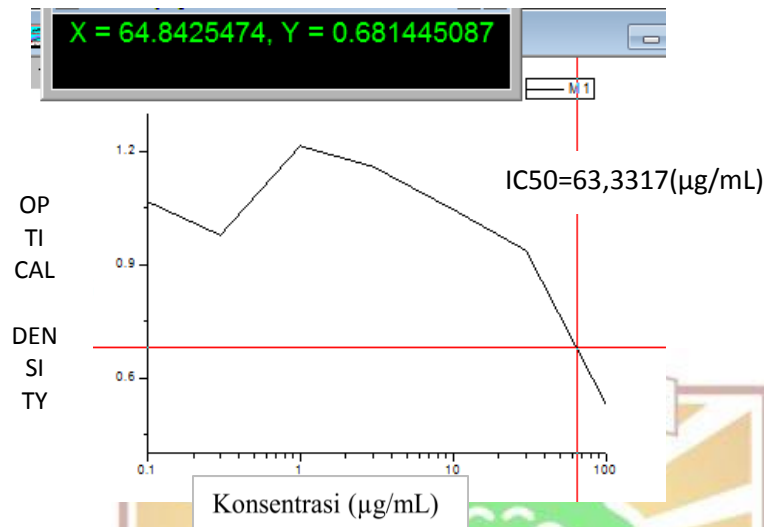


Lampiran-2

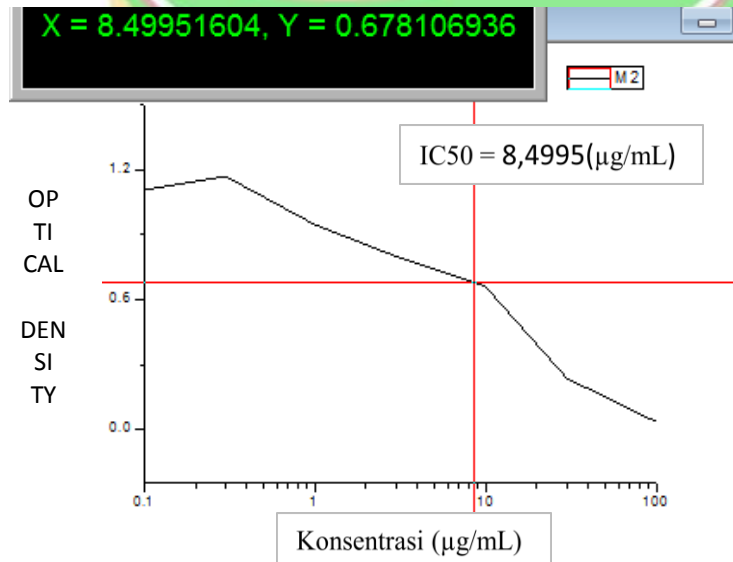


Gambar Bagan Alir Isolasi, Karakterisasi dan Uji Bioaktifitas Isolat Dari Kulit Batang *Callicarpa arborea* Roxb

Lampiran 3. Grafik Aktifitas Krista-1, 2 dan 3 Terhadap Uji Antikanker.

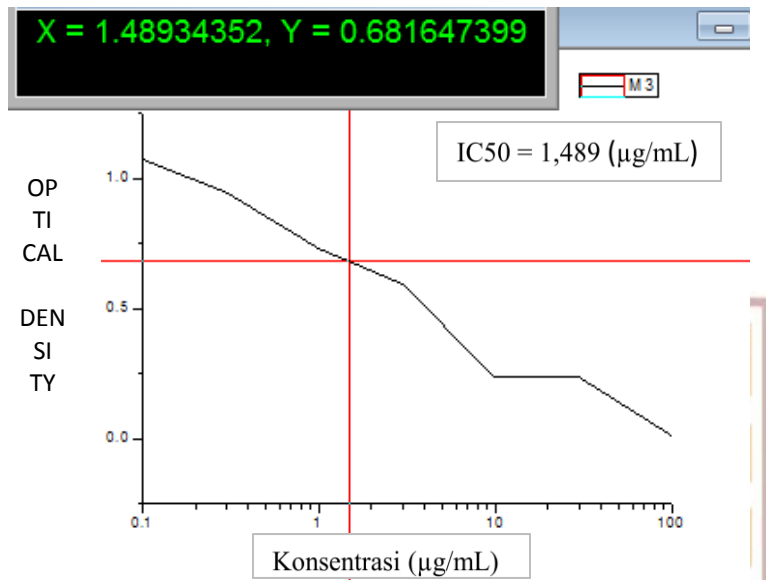


Gambar Grafik Aktifitas Senyawa Kristal-1 Sebagai Antikanker Sel Murine Leukemia P388



Gambar Grafik Aktifitas Kristal-2 Sebagai Antikanker Sel Murine Leukemia P388

Lampiran 3. (Sambungan)



Gambar Grafik Aktifitas Kristal-3 Sebagai Antikanker Sel Murine Leukemia P388



Lampiran 4. Data Optikl Densiti dari Kristal-1, Kristal-2 dan Kristal-3

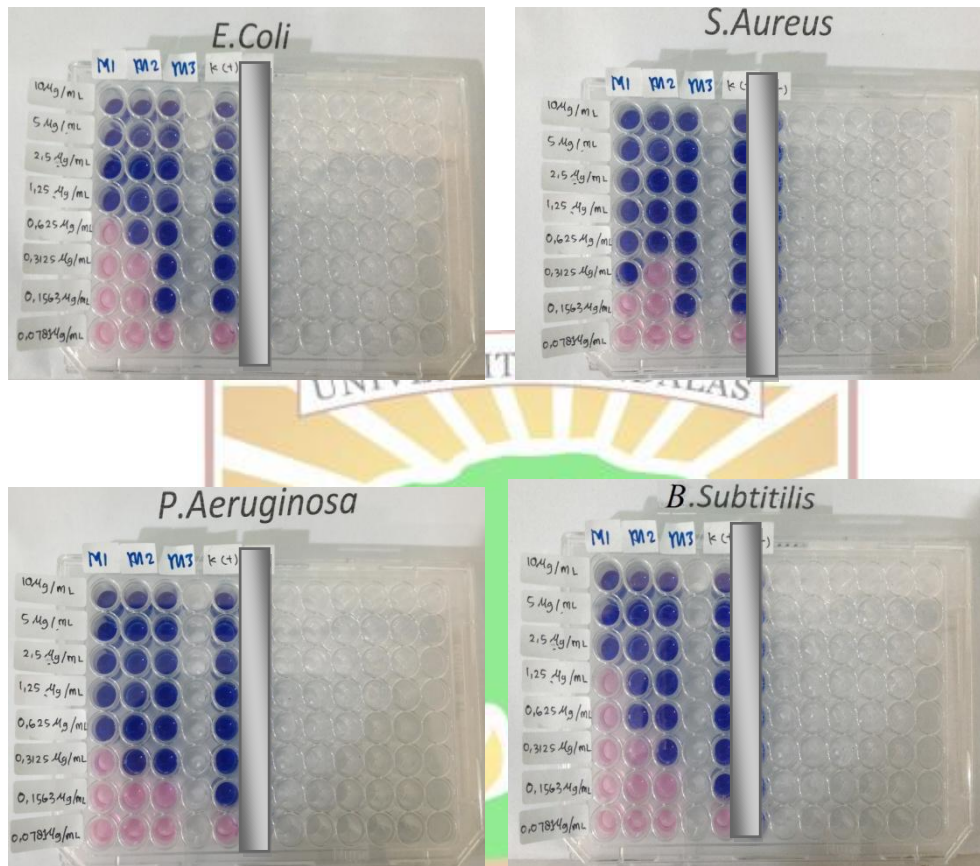
Tabel Data Optikl Densiti dari Kristal-1, Kristal-2 dan Kristal-3
Uji Antikanker P388

[Kristal] µg/mL	Optikal Densiti		
	Kristal-1	Kristal-2	Kristal-3
100	0,631999	0,034999	0,013333
30	0,937333	0,235666	0,236666
10	1,045999	0,661666	0,235666
3	1,159333	0,79933	0,594333
1	1,213666	0,946999	0,731930
0,3	1,194111	1,169999	0,946999
0,1	1,234666	1,107333	1,074999

Kontrol positif (Artonin E): 1.3601



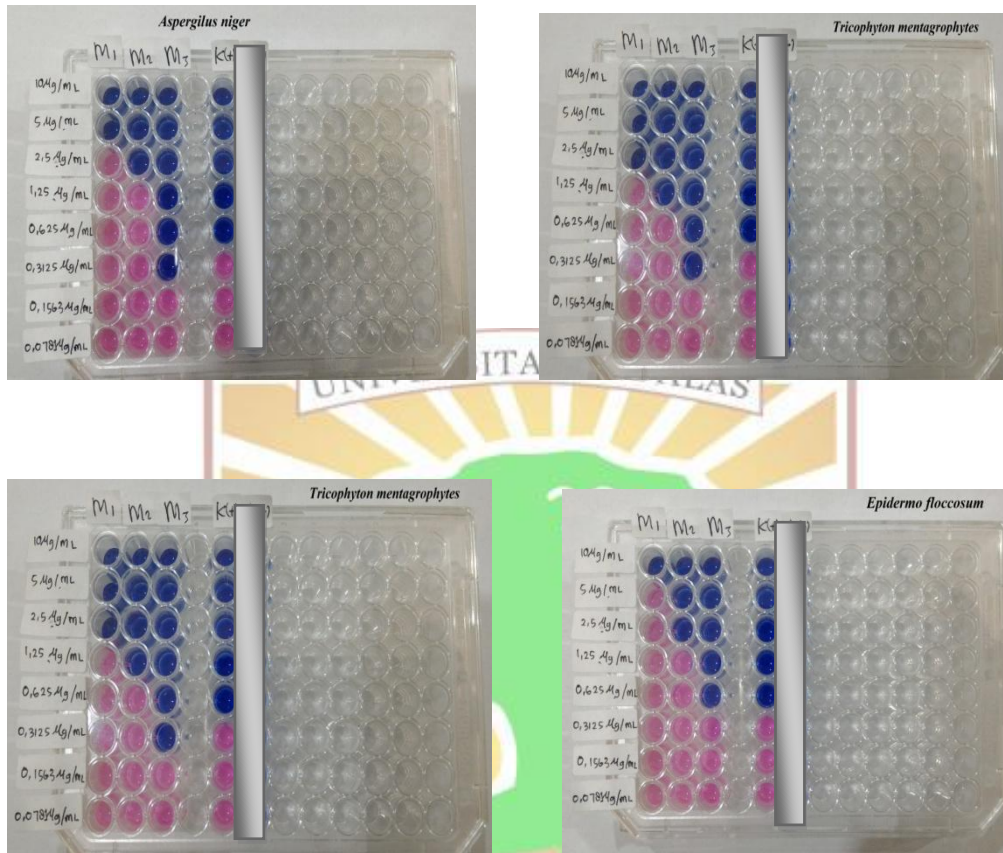
Lampiran 5. Gambar Plat Sumur 96 Uji Antibakteri Dari Senyawa Isolat



Catatan: M1= Kristal-1; M2 = Kristal-2, M3 = Kristal-3
 ug/mL = Satuan konsentrasi Senyawa
 k(+) = Kontrol (+)



Lampiran 6. Gambar Plat Sumur 96 Uji Antijamur Dari Senyawa Isolat



Catatan: M1= Kristal-1; M2 = Kristal-2, M3 = Kristal-3
ug/mL = Satuan konsentrasi Senyawa
k(+) = Kontrol (+)