

**Sintesis Senyawa Analog UK-3A
 β -Hidroksipikolinil serin etil heptanoil ester
dan β -Hidroksipikolinil serin etil oktanoil ester
serta Uji Sitotoksisitas**

Tesis Magister Ilmu Kimia

Oleh:

Edward Julys Dompeipen

0606001683



**Program Pasca Sarjana Ilmu Kimia
Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Indonesia
2007**





Dipersembahkan kepada,

Papa dan Mama yang tercinta,.....

Feni Timbayo istriku, David, Paul dan Theofanie anak-anakku

**Sintesis Senyawa Analog UK-3A
 β -Hidroksipikolinil serin etil heptanoil ester
dan β -Hidroksipikolinil serin etil oktanoil ester
serta Uji Sitotoksitas**

**Tesis ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains**

Oleh:

Edward Julys Dompeipen


0606001683

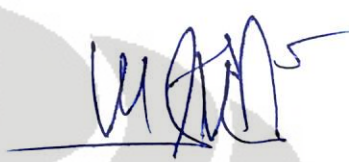


**Program Pasca Sarjana Ilmu Kimia
Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Indonesia
2007**

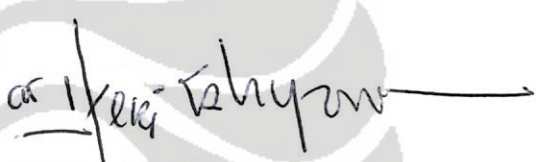
LEMBAR PERSETUJUAN


Tesis ini disetujui oleh:



Prof. Dr. Soleh Kosela, M.Sc.
Pembimbing I


Dr. Muhammad Hanafi
Pembimbing II


Prof. Dr. Wahyudi Priyono suwarso
Ketua Penguji


Dr. Herry Cahyana
Sekretaris Penguji


Dr. Endang Saepudin
Anggota Penguji


Dr. rer nat. Budiawan
Anggota Penguji




Prof. Dr. Wahyudi Priyono suwarso

Ketua Program Magister Ilmu Kimia
PPs-FMIPA-Universitas Indonesia.

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Kuasa, yang telah melimpahkan rahmat dan karunia sehingga tesis yang berjudul "Sintesis Senyawa Analog UK-3A β -Hidroksipikolinil Serin Etil Heptanoil Ester dan β -Hidroksipikolinil Serin Etil Oktanoil Ester Serta Uji Sitotoksitas ini dapat terselesaikan.

Penulis menyadari tanpa adanya bantuan dari berbagai pihak, tidaklah mungkin penulis dapat menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

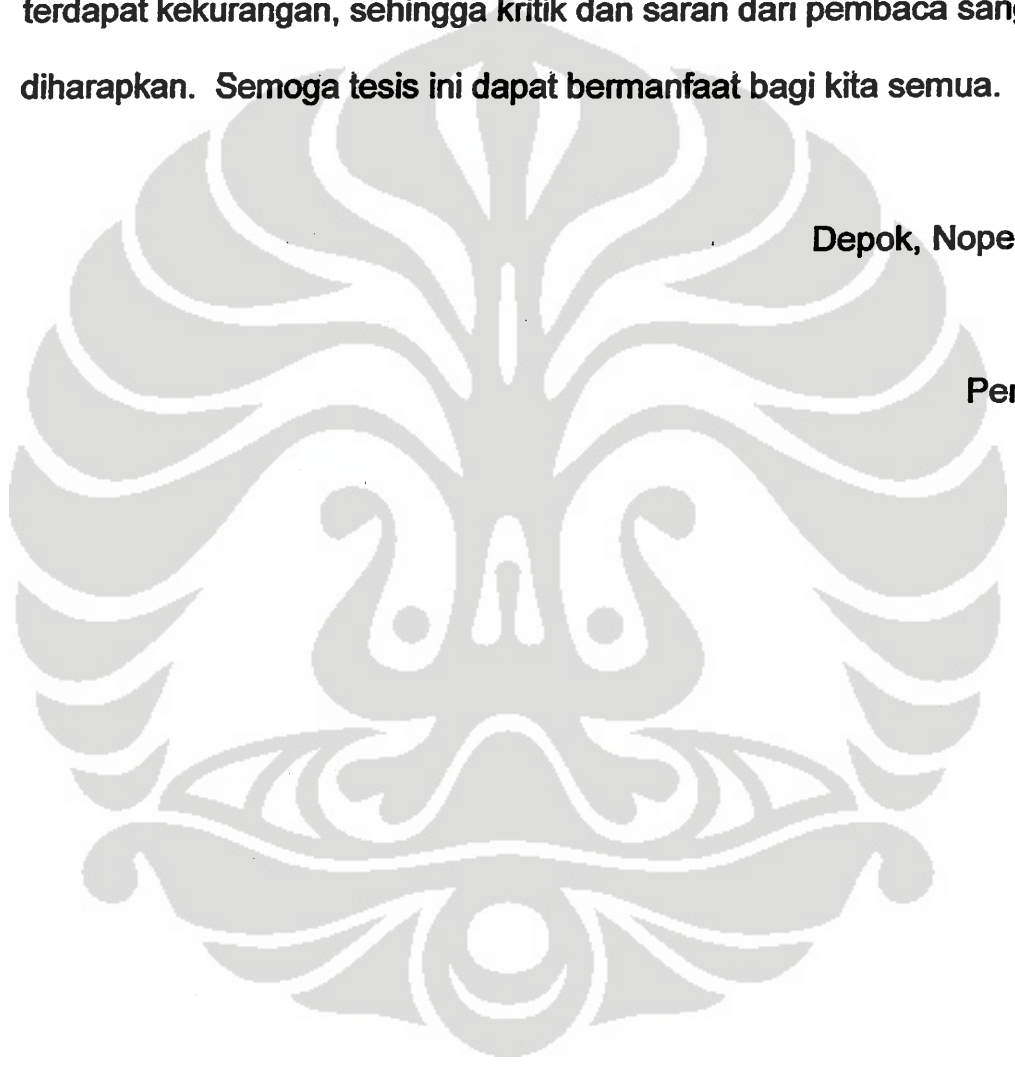
1. Prof.Dr.Soleh Kosela.,MSc, selaku Pembimbing I, yang telah membimbing penulis dalam penyelesaian tesis ini.
2. Dr.Mohammad Hanafi, selaku Pembimbing II, yang telah membimbing penulis dalam penyelesaian tesis ini.
3. Kepala Pusat Pendidikan dan Pelatihan Departemen Perindustrian Republik Indonesia, yang telah memberikan beasiswa kepada penulis
4. Kepala Balai Riset dan Standardisasi Industri Ambon, Ir.Aris Pabulang Torry, yang telah memberikan izin dan kesempatan untuk penulis melakukan tugas belajar.
5. Prof.Dr.Wahyudi Priyono Suwarso, selaku ketua Program Magister Ilmu Kimia PPs-FMIPA-Universitas Indonesia.
6. Para dosen pengajar di Program Magister Ilmu Kimia PPs-FMIPA-Universitas Indonesia.

7. Kedua orang tua yang melahirkan, mendidik dan membesarkan, serta kakak kakak, dan adik adik yang telah banyak membantu secara material dan spiritual.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan tesis ini masih banyak terdapat kekurangan, sehingga kritik dan saran dari pembaca sangat diharapkan. Semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Depok, Nopember 2007

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PERSETUJUAN.....	ii
PRAKATA.....	iii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
ABSTRAK.....	x
<i>ABSTRACT</i>	xii
I. PENDAHULUAN.....	1
I.1. Latar Belakang.....	1
I.2. Perumusan Masalah.....	6
I.3. Tujuan dan Manfaat Penelitian.....	7
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	9
II.1. Senyawa UK 3-A.....	9
II.2 Modifikasi Struktur Molekul.....	14
II.3.Sintesis Senyawa Analog UK-3A.....	15
II.4.Reaksi Esreifikasi.....	18
II.5.Reaksi Amidasi.....	20
II.6.Uji Sitotoksisitas.....	22

II.7. <i>Artemia salina</i> Leach.....	26
II.8. Penyakit Kanker.....	27
III. METODOLOGI PENELITIAN	33
III.1. Waktu dan Tempat Penelitian	33
III.2. Bahan dan Alat Penelitian	33
III.3. Prosedur Penelitian	34
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	43
IV.1. Sintesis Senyawa Analog UK-3A.....	43
IV.2. Sintesis Senyawa PSEE.....	46
IV.3. Sintesis Senyawa PSEHE dan PSEOE.....	55
IV.4. Uji Toksisitas Brine Shrimp Lethality Test.....	66
IV.5. Uji Sitotoksisitas terhadap Sel <i>Murine Leukemia</i> P 388...	68
IV.6. Stereokimia Senyawa PSEHE dan PSEOE	70
V. KESIMPULAN DAN SARAN	72
V.1. Kesimpulan	72
V.2. Saran	73
DAFTAR PUSTAKA.....	74
LAMPIRAN	77

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1. Struktur molekul senyawa UK-3A	4
2. Struktur molekul senyawa UK-2A dan UK-3A.....	10
3. Struktur senyawa UK-2A (OMe) dan UK-2A (NMe) . dan hasil reaksi hidrolisis senyawa UK-2A	11
4. Struktur senyawa <i>Antimycin A₃</i>	12
5. Retrosintesis senyawa PSEHE dan PSEOE	16
6. Tahapan reaksi pembentukan senyawa PSEHE dan PSEOE.....	17
7. Persamaan reaksi esterifikasi secara umum	18
8. Mekanisme pembentukan amida menggunakan aktivator DCC.....	21
9. Mekanisme reaksi katalisis dengan DMAP	22
10. Reaksi reduksi MTT menjadi formazan.....	24
11. Tahapan terjadinya Kanker.....	30
12. Mekanisme pembentukan senyawa PSEE	47
13. Reaksi ninhidrin dengan asam amino.....	49
14. Struktur molekul senyawa PSEE.....	52
15. Mekanisme reaksi pembentukan senyawa PSEHE dan PSEOE.....	56
16. Struktur molekul senyawa PSEHE dan PSEOE	60

DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1. Hasil uji hambatan pertumbuhan sel kanker senyawa UK-2A, UK-3A, antimycin A ₃ , UK-2(OMe) dan UK-2(NMe) (IC ₅₀ μg/mL)	12
2. Data Pergeseran kimia (δ, ppm) senyawa PSEE dari spektra ¹ H-NMR dan ¹³ C-NMR	53
3 Data pergeseran kimia (δ, ppm) dari spektra ¹ H-NMR dan ¹³ C-NMR Senyawa PSEHE dan PSEOE	60
4. Data hasil uji Brine Shrimp Lethality Test.....	66
5. Data sitotoksisitas senyawa PSEHE, PSEOE dan UK 3A terhadap sel kanker <i>Murine leukemia P 388</i>	69

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Skema kerja penelitian.....	77
2. Perhitungan rendemen.....	83
3. Analisis KLT dan perhitungan Rf.....	85
4a. Kromatogram dan spektra LC-MS PSEE.....	88
4b. Kromatogram dan spektra LC-MS PSEHE.....	89
4c. Kromatogram dan spektra LC-MS PSEOE.....	90
5a. Spektra FTIR PSEE.....	91
5b. Spektra FTIR PSEHE.....	92
5c. Spektra FTIR PSEOE.....	93
6a. Spektra $^1\text{H-NMR}$ PSEE.....	94
6b. Spektra $^{13}\text{C-NMR}$ PSEE.....	95
7a. Spektra $^1\text{H-NMR}$ PSEHE.....	96
7b. Spektra $^{13}\text{C-NMR}$ PSEHE.....	97
8a. Spektra $^1\text{H-NMR}$ PSEOE.....	98
8b. Spektra $^{13}\text{C-NMR}$ PSEOE.....	99
9. Hasil Bioassay terhadap Sel Kanker <i>Murine Leukemia</i> P 388 .	100
10a. Perhitungan Putaran Optis Spesifik Senyawa PSEHE.....	101
10b. Perhitungan Putaran Optis Spesifik Senyawa PSEOE.....	102

ABSTRAK

Senyawa β -hidroksipikolinil serin etil heptanoil ester (PSEHE) dan β -hidroksipikolinil serin etil oktanoil ester (PSEOE) adalah senyawa baru yang diperoleh dari modifikasi struktur senyawa UK-3A yang telah diketahui mempunyai aktivitas yang tinggi sebagai antijamur, antibakteri dan antikanker. Hasil penelitian diharapkan didapatkan senyawa analog UK-3A dengan rendemen yang tinggi, lebih ekonomis, dan lebih aktif. Tujuan penelitian ini adalah menghitung kemurnian PSEHE dan PSEOE yang diperoleh dan mengetahui nilai LC_{50} PSEHE dan PSEOE terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dan nilai IC_{50} sel kanker *Murine leukemia* P 388. Sintesis senyawa ini dihasilkan melalui 2 tahap reaksi kimia. Tahap pertama yaitu reaksi amidasi L-serin etil ester hidroklorida dengan asam β -hidroksipikolinat menggunakan aktivator DCC (*N,N*-disikloheksilkarbodiimida) dan katalis DMAP (4-dimetilaminopiridin) dalam pelarut piridin menghasilkan senyawa β -hidroksipikolinil serin etil ester (PSEE). Tahap kedua yaitu reaksi esterifikasi PSEE hasil sintesis tahap pertama dengan asam heptanoat dan asam oktanoat menggunakan aktivator DCC dan katalis DMAP dalam pelarut kloroform menghasilkan senyawa PSEHE dan PSEOE. Analisis pendahuluan dilakukan dengan kromatografi lapis tipis, dilanjutkan pemurnian dengan ekstraksi pelarut, dan kromatografi kolom silika gel menggunakan fase gerak campuran n-heksana dan etil asetat. Identifikasi senyawa hasil sintesis dilakukan dengan spektrometer LC-MS, spektrofotometer FT-IR, 1H -NMR, dan ^{13}C -NMR. Senyawa PSEE hasil

reaksi tahap pertama diperoleh kemurnian sebesar 85,22 % sedangkan PSEHE dan PSEOE hasil reaksi tahap kedua diperoleh kemurnian sebesar 94,48 % dan 86,24 % . Senyawa PSEHE dan PSEOE yang diperoleh tersebut diuji daya sitotoksitasnya terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dan sel kanker *Murine leukemia* P 388. Hasil uji dengan Brine Shrimp Lethality Test didapatkan nilai LC_{50} PSEHE adalah 933,25 ppm dan PSEOE adalah 549,54 ppm. Hasil uji dengan sel kanker *Murine leukemia* P 388 didapatkan nilai IC_{50} untuk PSEHE adalah 38,0 $\mu\text{g/ml}$ dan untuk PSEOE adalah 53,0 $\mu\text{g/ml}$.

Kata kunci : UK-3A, *Murine leukemia* P 388, *Artemia salina* Leach

ABSTRACT

The novel compounds of β -hydroxypicolinyl serine ethyl heptanoyl ester (PSEHE) and β -hydroxypicolinyl serine ethyl octanoyl ester (PSEOE) were obtained from modification of UK-3A compound that had been known possessing high activity as antifungal, antibacteria and anticancer. From this research it is expected to obtain UK-3A analogue's compound that have higher yield, more economic, and active too. The aims of this research are to purify both PSEHE and PSEOE yields and to know LC_{50} values for *Artemia salina* Leach and . IC_{50} values for *Murine leukemia* P 388 cells.

The synthesis of these compounds were carried out in two step reactions. The first step was amidation L-serine ethyl ester.HCl with β -hydroxypicolinyl acid using DCC (*N,N*-dicyclohexylcarbodiimide) and DMAP (4-dimethylaminopyridine) as catalyst and activator in pyridine to produce β -hydroxypicolinyl serine ethyl ester. The second step was esterification of β -hydroxypicolinyl serine ethyl ester with heptanoic acid and octanoic acid used DCC and DMAP in chloroform to produce PSEHE and PSEOE. Preliminary analysis was carried out with thin layer chromatography and followed by purification using extraction, and then column chromatography on silica gel, eluted with n-hexane and ethyl acetate. Subsequently both synthesis products were identified using LC-MS spectrometer, FT-IR spectrophotometer, 1H -NMR, and ^{13}C -NMR.

The pure compound of PSEE from the first step was 85,22% and afterwards pure compound of PSEHE and PSEOE from the second step were 94,48% and 86,24%.The results of sitoxicity test using Brine Shrimp Lethality Test shown that PSEHE and PSEOE with value LC_{50} 933,25 ppm and 549,54 ppm.The results of sitoxicity test using *Murine leukemia* P 388 cells shown that PSEHE and PSEOE with value IC_{50} 38,0 μ g/ml and 53,0 μ g/mL.

Keywords : UK-3A, *Murine leukemia* P 388, *Artemia salina* Leach

I. PENDAHULUAN

I.1. Latar Belakang

Kemajuan yang semakin pesat dalam berbagai bidang memiliki dampak secara langsung pada pola hidup masyarakat, tidak terkecuali pada pola makan yang semakin buruk, terutama dengan adanya penggunaan bahan kimia dalam berbagai jenis makanan. Pencemaran juga dapat memperburuk kondisi kesehatan masyarakat saat ini. Hal ini dapat mengakibatkan munculnya berbagai jenis penyakit yang banyak menjadi faktor paling dominan penyebab kematian seseorang, salah satunya adalah penyakit kanker.

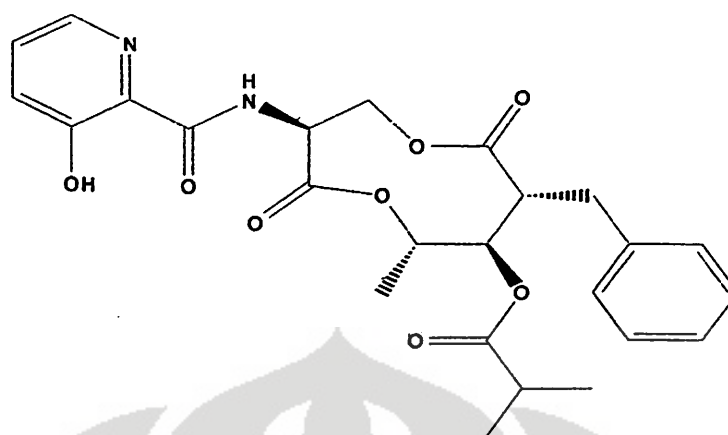
Kanker merupakan salah satu penyakit yang berbahaya dan sering menyebabkan kematian. Menurut organisasi kesehatan dunia setiap tahun jumlah penderita kanker di dunia bertambah 6,25 juta orang. Diperkirakan dalam 10 tahun mendatang 9 juta orang akan meninggal setiap tahun akibat kanker. Dua pertiga dari penderita kanker di dunia berada di negara-negara yang sedang berkembang. Indonesia sebagai salah satu negara berkembang, diperkirakan setiap tahunnya memiliki 100 penderita kanker yang baru dari setiap 100.000 penduduk. Menurut hasil Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) Departemen Kesehatan RI, kematian yang disebabkan kanker meningkat dari tahun ke tahun, sebesar: 4,5 % (1989), 4,7% (1992), dan 4,9 % (1995) (Anonim, 2005).

Menurut Anonim (2005) penyakit kanker dapat terjadi pada berbagai organ tubuh manusia. Beberapa jenis penyakit kanker diantaranya adalah penyakit kanker leher rahim, payudara, hati, paru, kulit, darah (*leukemia*), dan usus besar (*Colon*). Kanker darah atau *leukemia* merupakan penyakit kanker yang paling banyak menyerang anak-anak. *Leukemia* biasanya menjangkiti anak usia tiga hingga enam tahun dan lebih banyak diderita anak laki-laki. Penderita kanker darah dapat mencapai 25-30 persen dari seluruh penderita kanker. Menurut dr. Djajadiman Gatot dari sub bagian hematologi-onkologi, bagian ilmu kesehatan anak Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo (FKUI-RSCM), *leukemia* merupakan jenis kanker yang paling banyak terjadi pada anak (30-40 persen), disusul tumor otak (10-15 persen) dan kanker mata/retinoblastoma (10-12 persen). Kanker jenis lain yang sering menyerang anak-anak diantaranya kanker kelenjar getah bening, kanker saraf, dan kanker ginjal (Anonim, 2003).

Besarnya jumlah penderita kanker yang dapat menyebabkan tingginya angka kematian mendorong adanya upaya pencegahan dan pengobatan yang lebih tepat. Penelitian tentang berbagai obat yang berpotensi sebagai antikanker saat ini sudah banyak dilakukan mulai dari hasil isolasi bahan alam sampai dengan obat hasil sintesis. Senyawa obat yang diperoleh dari hasil isolasi bahan alam baik dari tumbuhan, hewan maupun mikroorganisme terdapat dalam jumlah yang terbatas, sehingga perlu dilakukan pengembangan sintesis senyawa obat yang memiliki

struktur yang sama atau mirip dengan senyawa hasil isolasi, namun memiliki aktivitas antikanker yang sama atau bahkan lebih besar.

Senyawa antibiotika baru yaitu UK-2 sebagai komponen utama dan UK-3 sebagai komponen minor telah berhasil diisolasi dari *Streptomyces* sp. 517-02. Senyawa UK-3 merupakan senyawa kompleks yang terdiri dari lima komponen yaitu: UK-3A, UK-3B, UK-3C, UK-3D, dan UK-3E. Senyawa antibiotika UK-3A memiliki aktivitas penghambatan yang tinggi terhadap pertumbuhan jamur, mikroba dan sel kanker, sehingga berpotensi untuk dijadikan sebagai salah satu obat antifungi, antibakteri dan antikanker (Hanafi, 1995). Senyawa antibiotika UK-3A telah terbukti memiliki aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan sel kanker *Murine leukemia* P388. Hal ini ditunjukkan dengan diperolehnya nilai IC_{50} sebesar 38 $\mu\text{g/mL}$ (Ueki, *et al.*, 1997). Menurut Hanafi (1995) struktur senyawa UK-3A (Gambar 1) memiliki gugus hidroksi dan amida (CONH) yang merupakan gugus aktif dan menunjukkan aktivitas penghambatan yang tinggi terhadap pertumbuhan sel kanker. Aktivitas yang tinggi juga ditentukan oleh keberadaan gugus dilakton atau diester yang merupakan gugus yang mempunyai sifat sebagai gugus lipofilik.



Gambar 1. Struktur molekul senyawa UK-3A (Hanafi, 1995).

Senyawa analog UK-3A dapat disintesis dengan tidak menghilangkan gugus aktif yang berperan penting dalam meningkatkan aktivitasnya. Teknik yang dapat dilakukan diantaranya mengubah gugus dilakton rantai tertutup dengan gugus yang mengandung rantai panjang, rantai pendek, dan atau gugus yang mengandung senyawa aromatik, sehingga menjadi rantai terbuka. Variasi penggantian gugus tersebut diharapkan dapat menunjukkan data mengenai gugus yang berperan dalam meningkatkan aktivitas senyawa analog UK-3A (Hanafi, 1997 ; Ueki, *et al.*, 1997).

Penelitian ini dilakukan untuk mensintesis dua senyawa analog UK-3A yaitu senyawa β -hidroksipikolinil-serin-etil-heptanoil-ester dan β -hidroksipikolinil-serin-etil-oktanoil-ester dengan harapan dapat memperoleh senyawa yang lebih aktif. Penggantian gugus alkil pada rantai panjang yaitu dengan menggantikan asam heptanoat dengan asam oktanoat pada reaksi tahap akhir dilakukan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap aktivitas daya bunuh *invivo* terhadap *Artemia*

salina Leach dan uji invitro terhadap sel *Murine leukemia* P 388. Penelitian ini juga dilakukan untuk mengetahui jumlah kemurnian senyawa yang dihasilkan dari proses sintesis.

Sintesis senyawa ini dilakukan melalui dua tahapan reaksi yaitu amidasi dan esterifikasi. Bahan dasar yang digunakan adalah senyawa L-serin-etil-ester, asam 2-hidroksipikolinat, asam oktanoat dan asam heptanoat. Tahap pertama dilakukan reaksi L-serin-etil-ester dengan asam 2-hidroksipikolinat menggunakan aktivator dan katalis N,N'-disikloheksil karbodiimida (DCC) dan 4-dimetilaminopiridin (DMAP) menghasilkan produk asam 2-hidroksipikolinil-serin-etil-ester (PSEE). Produk reaksi tahap pertama pada tahap kedua direaksikan kembali dengan asam heptanoat dan asam oktanoat menggunakan aktivator dan katalis DCC dan DMAP sehingga dihasilkan produk senyawa β -hidroksipikolinil-serin-etil-heptanoil-ester (PSEHE) dan β -hidroksipikolinil-serin-etil-oktanoil-ester (PSEOE). Identifikasi senyawa hasil reaksi dilakukan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Proses pemurnian dilakukan dengan teknik ekstraksi, filtrasi, evaporasi, dan kromatografi kolom. Identifikasi struktur molekul dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer *Fourier Transform Infra Red* (FT-IR), spektrometer *Liquid Chromatography Mass Spectrometer* (LC-MS) dan spektrometer *Nuclear Magnetic Resonance* ($^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$).

Kedua senyawa analog UK-3A tersebut selanjutnya diuji toksisitasnya dengan menggunakan *Brine Shrimp Lethality Test*. (BSLT).

Brine Shrimp Lethality Test adalah suatu metode bioassay sederhana yang menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach untuk mengetahui efek toksisitas suatu senyawa dan dilakukan dan uji sitotoksisitas secara invitro terhadap sel *Murine leukemia P 388*.

1.2. Perumusan Masalah

Berdasarkan Latar belakang di atas dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

1. Berapa kemurnian produk senyawa β -hidroksipikolinil-serin-etil-heptanoil-ester dan β -hidroksipikolinil-serin-etil-oktanoil-ester yang dihasilkan ?
2. Berapa nilai LC_{50} senyawa β -hidroksipikolinil-serin-etil-heptanoil-ester dan β -hidroksipikolinil-serin-etil-oktanoil-ester terhadap larva udang *Artemia salina* Leach?
3. Berapa nilai IC_{50} senyawa β -hidroksipikolinil-serin-etil-heptanoil-ester dan β -hidroksipikolinil-serin-etil-oktanoil-ester terhadap sel kanker *Murine leukemia P 388*?

I.3. Tujuan dan Manfaat Penelitian

I.3.1. Tujuan penelitian:

Penelitian ini bertujuan:

1. Mensintesis senyawa analog UK-3A baru, yaitu senyawa β -hidroksipikolinil serin etil heptanoil ester (PSEHE) dan β -hidroksipikolinil serin etil oktanoil ester (PSEOE), dengan cara memodifikasi gugus aktif senyawa induk UK-3A.
2. Mengukur toksisitas senyawa hasil sintesis terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dan sitotoksitas terhadap sel kanker *Murine leukemia P 388*.

I.3.2. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini bermanfaat sebagai senyawa aktif baru yang memiliki efek sitotoksitas yang tinggi. Senyawa yang dihasilkan dapat digunakan sebagai calon obat antikanker yang bermanfaat untuk penyembuhan penyakit kanker yang masih sulit diatasi.

I.3.3. Hipotesis

1. Adanya gugus heptanoat dan oktanoat dapat mengganti gugus dilakton ester cincin sembilan sehingga didapatkan senyawa analog UK-3A yang lebih aktif.

2. Senyawa analog UK-3A, senyawa β -hidroksipikolinil serin etil heksanoil ester dan β -hidroksipikolinil serin etil oktanoil ester memiliki aktivitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dan sel kanker *Murine leukemia* P-388 yang setara atau lebih tinggi dari senyawa UK-3A.



II. TINJAUAN PUSTAKA

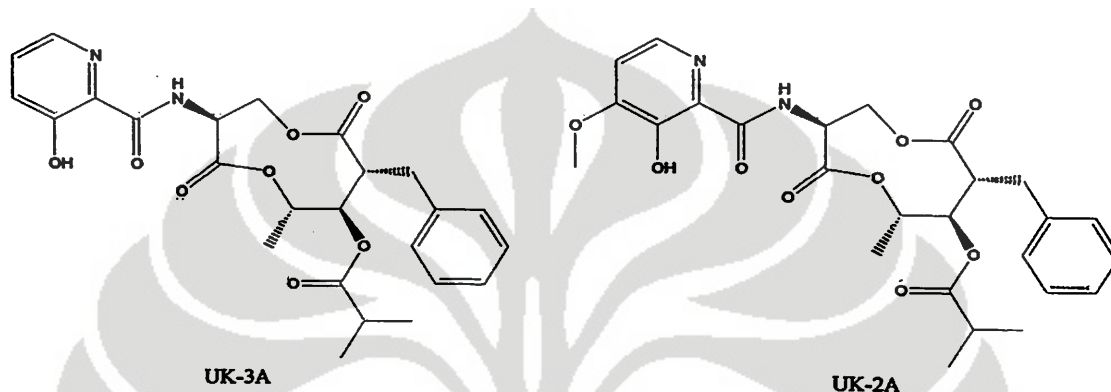
II.1. Senyawa UK-3A

Menurut daftar obat esensial yang dikeluarkan oleh WHO (1985) menunjukkan bahwa sumber obat dapat dikelompokkan sebagai berikut: hasil sintesis kimia (48,9%), semisintetik (9,5%), tumbuh-tumbuhan (11,1%), hewan (8,7%), dan mikroorganisme (6,4%). Penelitian untuk menemukan obat baru dalam waktu yang relatif singkat dapat dilakukan dengan membuat senyawa analog atau modifikasi struktur molekul yang lebih sederhana tetapi mempunyai aktivitas lebih besar atau mendekati dari aktivitas senyawa aslinya (Siswandono & Soekardjo, 2000).

Bahan alamiah untuk pengobatan mulai dikembangkan dengan cara isolasi zat aktif dan identifikasi struktur molekulnya pada abad ke-19. Kemajuan teknologi saat ini memungkinkan untuk mensintesis atau memodifikasi struktur suatu senyawa yang sebelumnya telah ditemukan secara alamiah memiliki khasiat obat (Siswandono & Soekardjo, 2000). Penemuan obat baru dengan cara mengembangkan struktur senyawa induk yang sudah diketahui aktivitasnya lebih disukai karena lebih cepat dan lebih ekonomis.

Penemuan senyawa UK-3A yang berpotensi sebagai obat antikanker dari *Streptomyces* sp. 517-02 telah berhasil dilakukan. Senyawa UK-3A yang telah dielusidasi memiliki struktur yang mirip dengan struktur senyawa UK-2A yang merupakan komponen utama dari

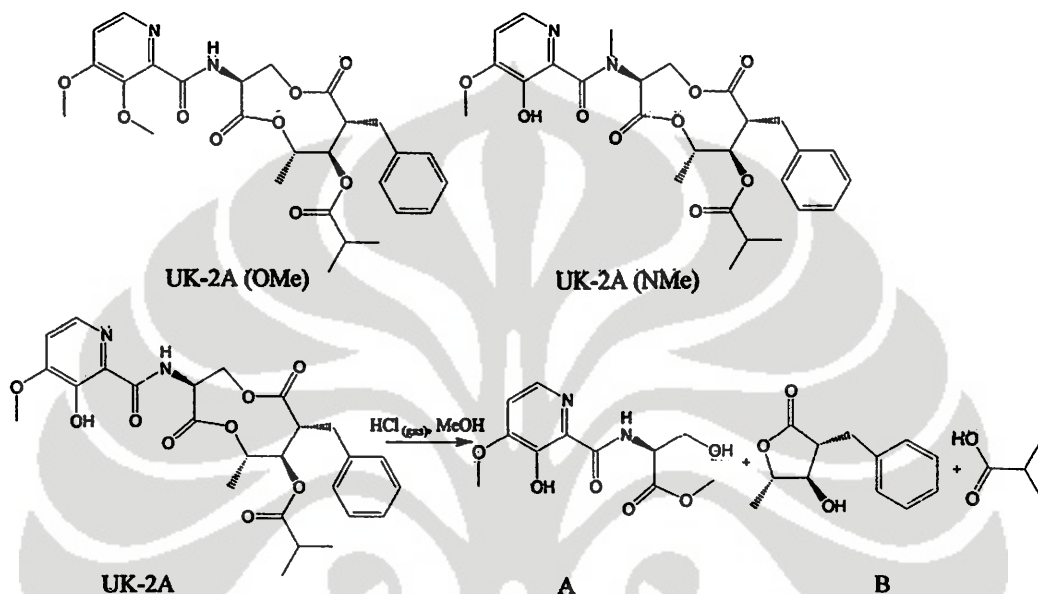
Streptomyces sp. 517-02. Senyawa UK-3A tidak memiliki gugus metoksi pada cincin piridin sebagaimana senyawa UK-2A (Gambar 2) dan berbentuk kristal jarum tidak berwarna. Senyawa UK-3A menunjukkan aktivitas antibakteri, antifungi dan antikanker (Hanafi, 1997 ; Ueki, *et al.*, 1997).



Gambar 2. Struktur molekul UK-3A dan UK-2A (Hanafi, 1997 ; Ueki, *et al.*, 1997).

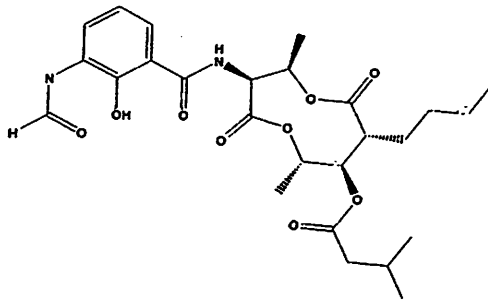
Studi hubungan struktur molekul dan aktivitas biologi sebagai dasar pengembangan sintesis senyawa analog UK-3A telah ditentukan berdasarkan data metilasi dan hidrolisis senyawa UK-2A yang memiliki struktur dan aktivitas yang hampir sama dengan senyawa UK-3A. Hal ini dilakukan untuk mendapatkan informasi gugus mana saja yang berperan dalam aktivitas biologi. Metilasi senyawa UK-2A dengan diazometan dihasilkan senyawa UK-2A (OMe) dan UK-2A (NMe) (Gambar 3) yang mengakibatkan hilangnya aktivitas antikanker. Hal ini menunjukkan bahwa gugus hidroksi pada cincin piridin dan NH (amida) merupakan gugus aktif. Hasil hidrolisis dengan menggunakan HCl gas dalam metanol senyawa UK-2A yaitu senyawa A (4-metoksi-3-hidroksipikolinil-metil-serin-ester) dan senyawa B (2-benzil-3-hidroksi-4-metil- γ -butirolakton) (Gambar 3) tidak

menunjukkan adanya aktivitas biologi. Hal tersebut membuktikan bahwa dilakton cincin sembilan merupakan gugus aktif yang bersifat lipofilik (Hanafi, *et al.*, 1996).



Gambar 3 .Struktur senyawa UK-2A (OMe) dan UK-2A (NMe) dan hasil reaksi hidrolisis senyawa UK-2A (Hanafi, *et al.*,1996).

Senyawa *Antimycin A₃* (Gambar 4) memiliki struktur yang menyerupai senyawa UK-2A dan UK-3A, sehingga digunakan sebagai standar uji untuk senyawa UK-2A dan UK-3A (Hanafi, *et al.*, 1996). *Antimycin A₃* dihasilkan dari *Streptomyces* sp. dan telah diketahui memiliki aktivitas antikanker yang sangat bagus (Rosalina, 1999).



Gambar 4. Struktur senyawa *Antimycin A₃* (Rosalina, 1999).

Senyawa UK-3A menunjukkan aktivitas yang tinggi dalam menghambat pertumbuhan sel kanker P388, sel kanker B16, sel kanker KB dan sel kanker COLO-201, terbukti dengan dicapainya nilai IC_{50} dibawah 4 $\mu\text{g/mL}$ pada beberapa jenis sel kanker tertentu. Hasil uji aktivitas antikanker senyawa UK-3A terhadap beberapa jenis sel kanker dan senyawa *Antimycin A₃* sebagai standar uji disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji hambatan pertumbuhan sel kanker senyawa UK-3A dan *Antimycin A₃* (IC_{50} $\mu\text{g/mL}$) (Ueki, et al, 1997).

Sel kanker	Senyawa UK-3A	<i>Antimycin A₃</i>
P388	38	0,015
B16	18	0,02
KB	20	0,063
COLO-201	45	0,018
3T3	100	15

Keterangan :

- P388 = *Mouse Leukemia*
- B16 = *Mouse Melanoma*
- KB = *Human Oral Epidermoid Carcinoma KB*
- COLO-201 = *Human Colon Adenocarcinoma COLO-201*
- 3T3 = *Mouse Fibroblast 3T3*

Struktur senyawa UK-3A memiliki gugus hidroksil dan amida yang merupakan gugus aktif dan menunjukkan aktivitas cukup tinggi sebagai antikanker. Aktivitas yang tinggi juga ditunjukkan oleh gugus dilakton atau diester yang merupakan gugus yang mempunyai sifat sebagai lipofilik (Hanafi, 1995).

Berdasarkan hal tersebut khususnya hubungan struktur kimia dan aktivitas biologi, maka dilakukan perancangan/modifikasi struktur molekul untuk mensintesis senyawa analog UK-3A dengan memvariasikan posisi gugus hidroksi (-OH) pada cincin aromatik, mengubah cincin piridin dengan fenol pada cincin aromatik dan mengubah gugus dilakton cincin sembilan menjadi rantai terbuka dengan harapan akan didapatkan senyawa baru dengan bahan dasar yang cukup murah, tetapi memiliki aktivitas yang lebih tinggi dan tidak menimbulkan efek samping (Hanafi, 1997).

II.2. Modifikasi Struktur Molekul

Modifikasi struktur molekul merupakan dasar pengembangan kimia organik. Dasar dari modifikasi struktur molekul adalah mengembangkan struktur senyawa induk yang sudah diketahui aktivitas biologisnya, kemudian disintesis dan diuji aktivitas biologis dari senyawa analognya. Menurut Siswandono dan Soekarjo (2000) modifikasi struktur molekul bertujuan untuk :

- a. Mendapatkan senyawa baru yang mempunyai aktivitas lebih tinggi, masa kerja lebih panjang, tingkat kenyamanan lebih besar, toksisitas atau efek samping lebih rendah, lebih selektif, lebih stabil, dan lebih ekonomis.
- b. Menemukan gugus farmakofor penting yaitu bagian molekul obat yang dapat memberikan aksi farmakologi.

Siswandono dan Soekarjo (2000) menyatakan bahwa menurut Schueler modifikasi struktur molekul mempunyai beberapa keuntungan sebagai berikut:

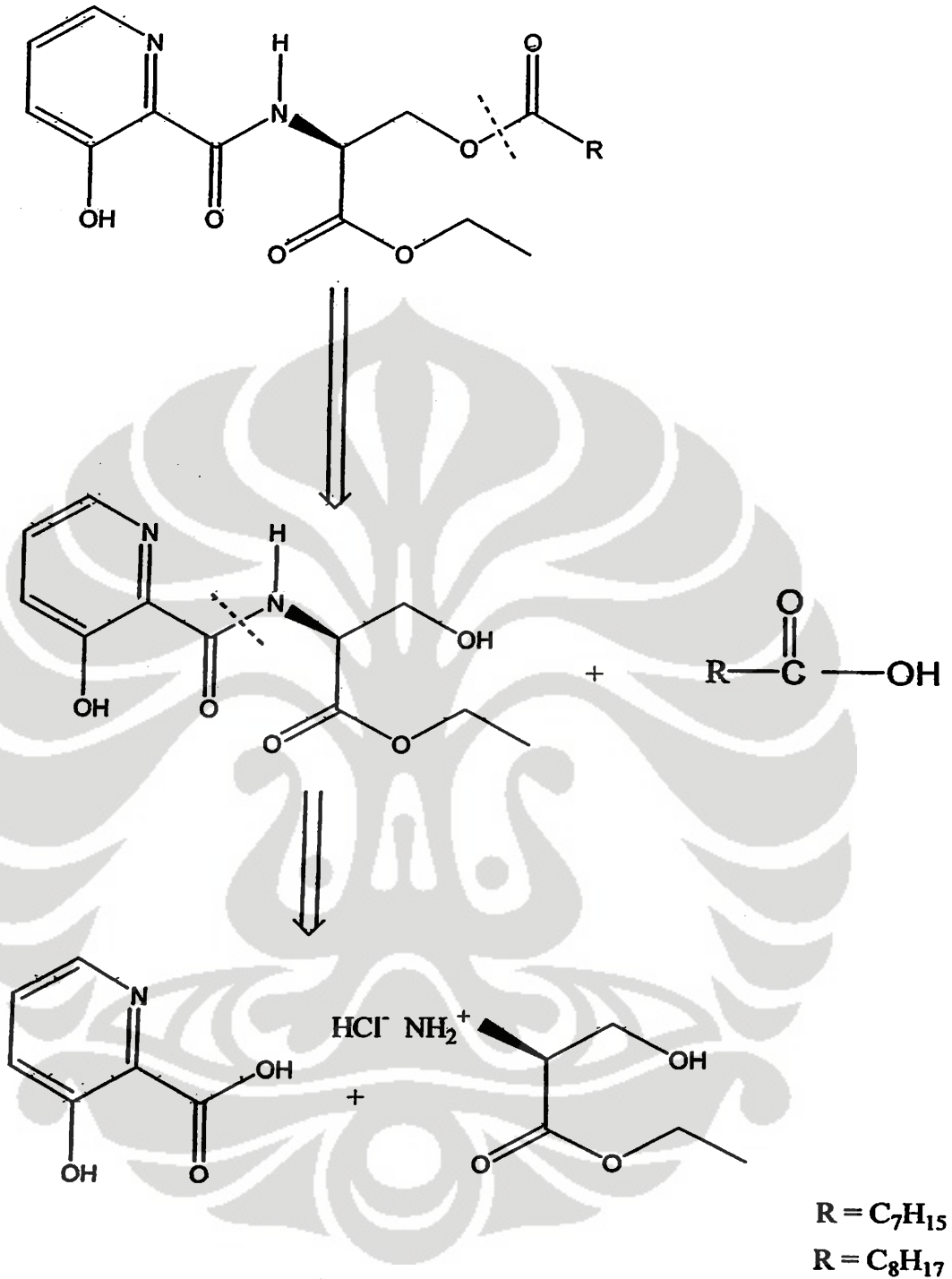
- a. Senyawa analog kemungkinan besar memiliki sifat farmakologi serupa dengan senyawa induk.
- b. Produk yang dihasilkan kemungkinan besar memiliki aktivitas farmakologi yang lebih tinggi.
- c. Data yang diperoleh dapat menjelaskan hubungan struktur dan aktivitas.

- d. Metode sintesis dan uji aktivitas biologis yang digunakan sama sehingga dapat menghemat waktu dan biaya.
- e. Produksi obat baru menjadi lebih ekonomis.

Modifikasi struktur molekul model pendekatan Topliss adalah memasukkan gugus-gugus yang mempunyai sifat lipofilik, elektronik, dan sterik tertentu pada struktur senyawa induk. Hal ini dilakukan dengan harapan akan dihasilkan senyawa yang memiliki aktivitas lebih tinggi atau minimal sama dengan aktivitas senyawa induk. Modifikasi struktur molekul model Topliss dilakukan melalui modifikasi struktur pada cincin aromatik dan modifikasi struktur pada rantai gugus alkil yang kemungkinan terdapat pada senyawa ester, keton, amin dan amida (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

II.3. Sintesis Senyawa Analog UK-3A

Senyawa analog UK-3A yang disintesis pada penelitian ini adalah senyawa β -hidroksipikolinil-serin-etil-heptanoil-ester dan β -hidroksipikolinil-serin-etil-oktanoil-ester. Reagen-reagen yang dibutuhkan dalam reaksi sintesis dapat diketahui dengan cara melakukan proses retrosintesis (Gambar 5).

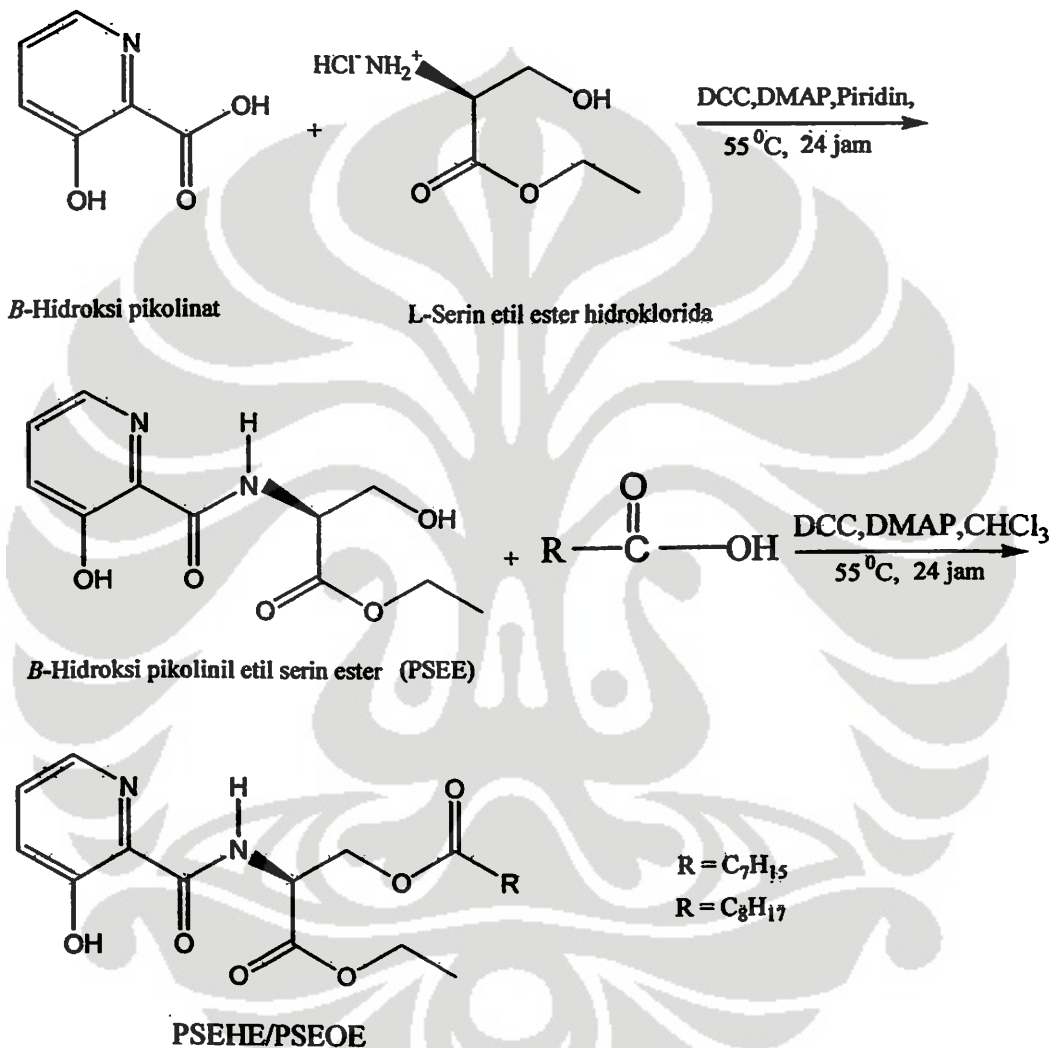


B-Hidroksi pikolinat

L-Serin etil ester hidroklorida

Gambar 5. Retrosintesis senyawa β -hidroksipikolinil-serin-etil-heptanoil-ester ($R=C_7H_{15}$) dan senyawa β -hidroksipikolinil-serin-etil oktanoil-ester ($R=C_8H_{17}$).

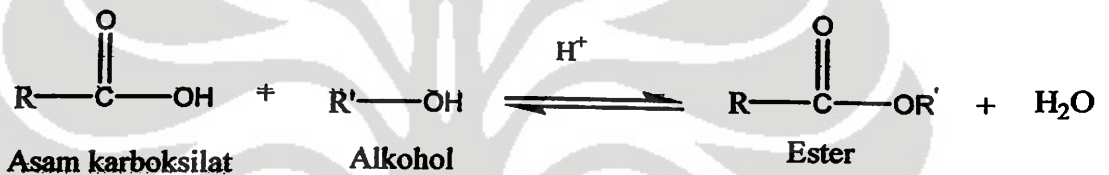
Berdasarkan hasil retrosintesis tersebut kemudian disusun tahapan reaksi dengan menambahkan reagen-reagen yang dibutuhkan. Tahapan reaksi pembentukan senyawa tersebut dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Tahapan reaksi pembentukan senyawa β -hidroksipikolinil-serin-etil-heptanoil-ester (R=C₇H₁₅) dan senyawa β -hidroksipikolinil-serin-etil-oktanoil-ester (R=C₈H₁₇).

II.4. Reaksi Esterifikasi

Menurut Fessenden dan Fessenden (1986) Ester merupakan senyawa organik yang sangat berguna, strukturnya dapat diubah menjadi bentuk senyawa lain. Suatu ester dapat dibentuk dengan reaksi langsung antara suatu asam karboksilat dengan suatu alkohol yang disebut dengan reaksi esterifikasi. Ester asam karboksilat suatu senyawa yang mengandung gugus $-\text{COOR}$ dengan R dapat berbentuk alkil maupun aril. Reaksi esterifikasi secara umum dapat digambarkan sebagai berikut :

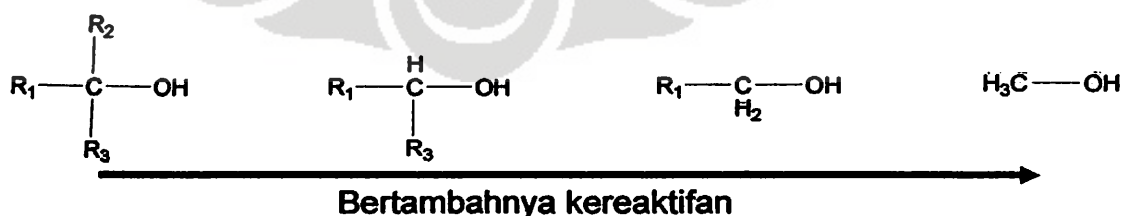


Gambar 7. Persamaan reaksi esterifikasi secara umum (Fessenden dan Fessenden, 1986).

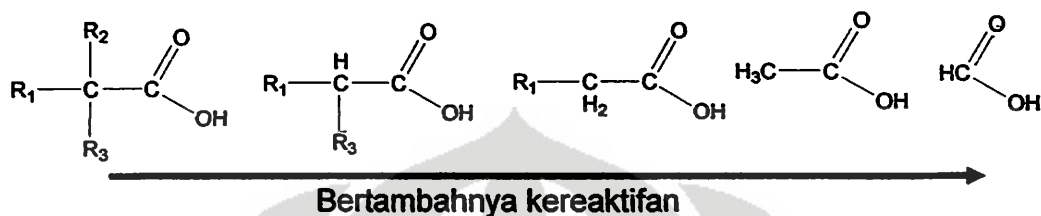
Laju reaksi esterifikasi suatu asam karboksilat tergantung pada:

1. Halangan sterik

Menurut Fessenden dan Fessenden (1986) halangan sterik dari alkohol dan asam karboksilat merupakan faktor yang paling berpengaruh terhadap laju reaksi esterifikasi. Urutan kereaktifan alkohol terhadap laju pembentukan ester adalah sebagai berikut :



Urutan kereaktifan asam karboksilat terhadap laju reaksi esterifikasi adalah sebagai berikut :



2. Katalis

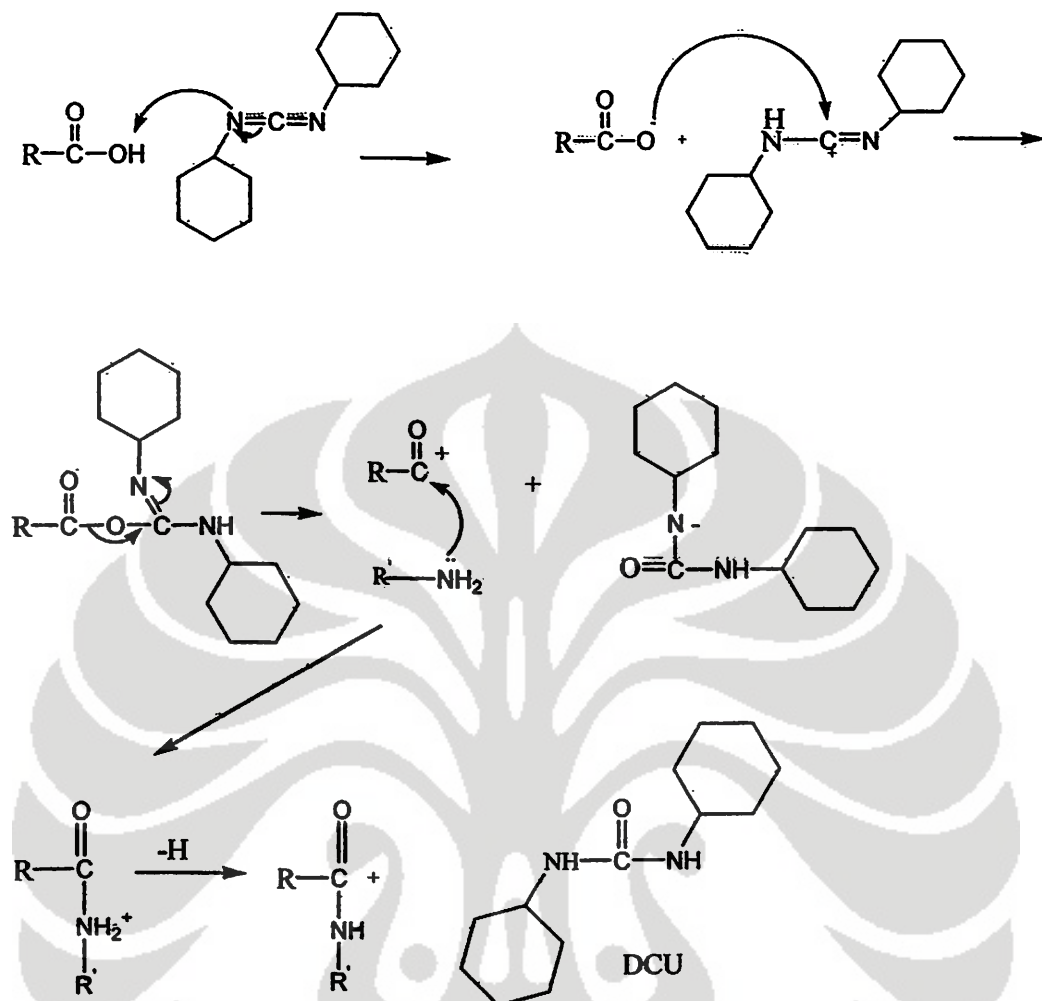
Nukleofil lemah seperti alkohol memiliki laju yang sangat lambat dalam menyerang atom karbonil RCOOH yang kurang reaktif. Sifat kereaktifan karbonil ini dapat ditingkatkan dengan cara protonasi, contohnya dengan menggunakan katalis asam. Katalis asam akan meningkatkan kemudahan lepasnya gugus pergi, yaitu pelepasan H_2O dari gugus asam karboksilat (Sykes, 1989).

Menurut Hanafi (1997) dalam reaksi esterifikasi selain digunakan katalis asam mineral seperti HCl , HClO_4 , H_2SO_4 , dan *p*-Toluensulfonat (*p*TsOH) juga digunakan aktivator dan katalis seperti DCC (*N,N'*-disikloheksilkarbodiimida) dan DMAP (4-dimetilaminopiridin). DCC berfungsi untuk mengaktifkan gugus karboksilat, sedangkan katalis DMAP berfungsi untuk mempercepat laju reaksi.

II.5. Reaksi Amidasi

Senyawa amida adalah senyawa turunan dari asam karboksilat yang terbentuk akibat adanya substitusi gugus hidroksil (OH) dengan gugus amina (NH_2). Reaksi amidasi dapat berlangsung secara optimal dengan adanya penggunaan aktivator dan katalisator. Aktivator yang umum digunakan adalah karbodiimidazol (CDI) dan DCC. Katalisator yang sering digunakan dalam reaksi amidasi adalah DMAP, N-hidroksibenzotriazol (HOBt), N-hidroksisuksinamida (HOSu) dalam berbagai pelarut seperti tetrahidrofuran (THF), diklorolometan, dimetilformamida (DMF), piridin, dan trietilamin (Carey & Sunberg, 1991).

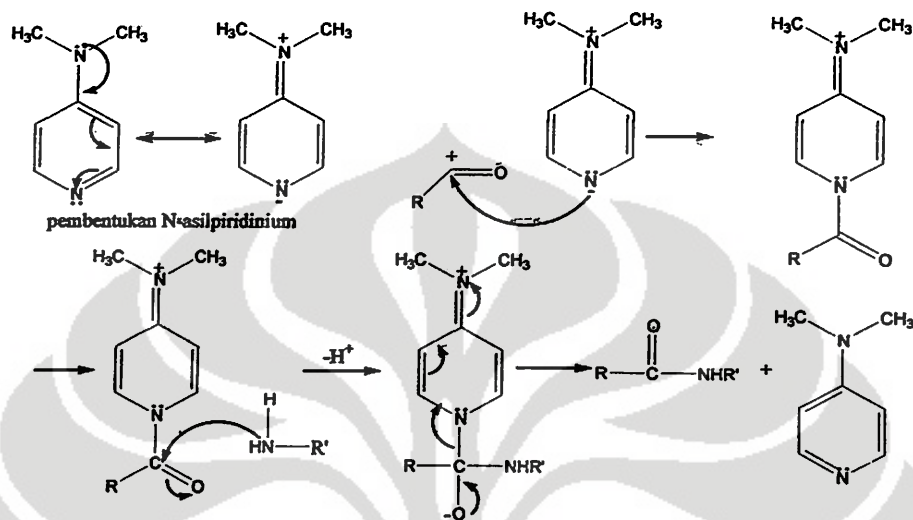
Senyawa N,N'-disikloheksilkarbodiimida (DCC) adalah senyawa yang berfungsi mengaktifkan gugus karboksilat menjadi suatu agen pengasilasi yang reaktif. Gugus aktif senyawa ini adalah isourea ($-\text{N}=\text{C}=\text{N}-$) yang mengandung atom pusat karbon yang kekurangan elektron sehingga sangat mudah diserang oleh nukleofilik. Gugus isourea ini sangat reaktif karena mampu memecah ikatan asil-oksigen dan mengubah ikatan rangkap karbon-nitrogen dari isourea menjadi gugus karbonil yang lebih stabil, sehingga pada akhir reaksi terbentuk amida dan disikloheksilurea (DCU) sebagai hasil samping (Carey & Sunberg, 1991). Mekanisme reaksinya dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Mekanisme reaksi pembentukan amida dengan aktivator DCC (Carey & Sunberg, 1991).

Senyawa 4-dimetilaminopiridin (DMAP) mempunyai efek katalitik yang kuat dan digunakan sebagai katalis nukleofilik. DMAP berfungsi sebagai substituen donor elektron, memperbesar efek nukleofilisitas dan kebasaaan dari nitrogen piridin. Mekanisme katalisis oleh DMAP melibatkan ion N-asilpiridinium (Gambar 9). Penggabungan aktivasi karboksil oleh DCC dan katalis DMAP merupakan suatu metode yang baik untuk mengaktivasi asam karboksilat ketika bereaksi dengan alkohol pada

temperatur kamar. Penggunaan gabungan katalis DMAP dan aktivator DCC dapat juga digunakan untuk reaksi pembentukan amida (Hanafi, 1997).



Gambar 9. Mekanisme katalisis oleh DMAP yang melibatkan ion N-asilpiridinium (Carey & Sunberg, 1991).

II.6. Uji Sitotoksitas

Uji sitotoksitas merupakan salah satu contoh uji yang digunakan untuk mengevaluasi keamanan suatu senyawa yang akan digunakan sebagai bahan obat, kosmetik, zat tambahan makanan dan pestisida dengan menggunakan kultur sel secara *in vitro*. Salah satu syarat uji sitotoksitas adalah sistem uji tersebut harus menghasilkan kurva dosis respon yang reproduksibel dan dapat menggambarkan efek senyawa uji yang sama bila diberikan secara *in vivo*. Sistem uji sitotoksitas ini merupakan uji kuantitatif dan kualitatif dengan cara menetapkan kematian sel (Freshney *dalam* Budi, 2006).

Uji sitotoksitas dilakukan secara *in vitro* untuk menentukan potensi sitotoksik senyawa-senyawa seperti produk-produk farmasi, kosmetik, dan obat-obat antikanker. Pengembangan metode *in vitro* sebagai alternatif pengganti pengujian menggunakan hewan uji mempunyai relevansi yang cukup baik yang bertujuan untuk mendeteksi potensi ketoksikan suatu obat pada manusia (Nurochmad dalam Rahmawati, 2004). Toksisitas merupakan kejadian kompleks secara *in vivo*, dimana terjadi kerusakan sel akibat penggunaan obat anti kanker yang bersifat sitotoksik atau karena efek-efek fisiologi seperti efek inflamasi, neurotoksisitas dan juga efek-efek sistemik. Uji *in vitro* harus dapat menggambarkan efek senyawa uji yang sama bila diberikan secara *in vivo*. Respon sel terhadap agen-agen sitotoksik dipengaruhi oleh kerapatan sel (Freshney dalam Rahmawati, 2004).

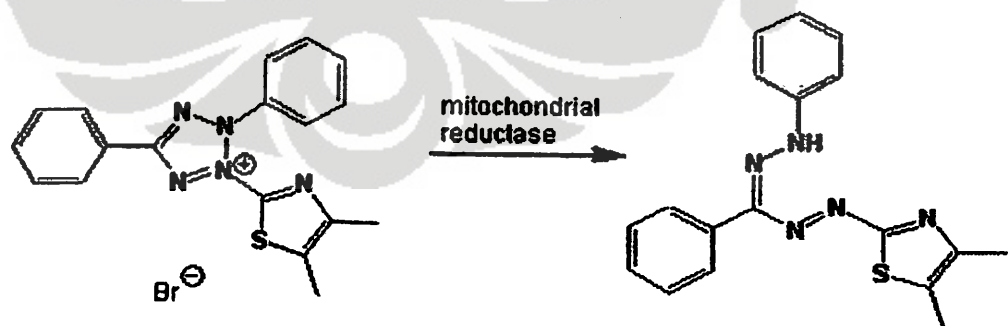
Keuntungan uji *in vitro* (Nurochmad dalam Rahmawati, 2004) diantaranya adalah sebagai berikut:

1. Digunakan sebagai tahap/langkah awal dalam penelitian.
2. Senyawa uji dalam pengujian hanya diperlukan sedikit.
3. Jumlah hewan yang dikorbankan untuk pengambilan berbagi organ target (liver, ginjal, kulit, paru, sistem syaraf, dll.) secara drastis dapat dikurangi.
4. Dapat memberi informasi secara langsung potensi efek obat pada sel target manusia yang secara ilmiah memberi hasil yang lebih valid

5. Digunakan untuk berbagai tujuan penggunaan kultur pengembangan suatu obat.

Uji sitotoksisitas secara *in vitro* dapat menggunakan sel primer maupun sub kultur sel yang merupakan turunan dari sel primer yang sering disebut *cell line* (Nurochmad dalam Rahmawati, 2004). *Cell line* yang digunakan dalam uji sitotoksisitas bisa berasal dari sel kanker manusia maupun hewan. Sel kanker hewan yang digunakan untuk uji sitotoksisitas harus memiliki kesamaan sifat dan karakteristik dengan sel kanker manusia (Harborne dan Dey, 1991).

Metode yang digunakan dalam uji sitotoksisitas salah satunya adalah metode MTT. Metode ini didasarkan atas pengukuran intensitas warna yang terjadi sebagai hasil metabolisme suatu substrat oleh sel hidup menjadi produk berwarna. Garam MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida) yang ditambahkan pada media akan direduksi oleh sistem reduktase suksinat tetrazolium yang terdapat di dalam mitokondria aktif menjadi formazan yang merupakan zat warna ungu (Wyllie *et. al.* dalam Budi, 2006), seperti terlihat dalam gambar 10 berikut ini :



Gambar.10.Reaksi reduksi MTT menjadi formazan.

Metode lain yang biasa digunakan dalam uji sitotoksitas adalah penghitungan jumlah sel langsung di bawah mikroskop dengan bantuan haemositometer dan metode pewarnaan menggunakan tripan biru (Sladowsky *et al.* dalam Budi, 2006).

II.7. Artemia Salina Leach

II.7.1. Taksonomi

Taksonomi dari larva udang air laut *Artemia salina Leach* adalah sbb :

Philia	:	Arthropoda
Class	:	Crustaceae
Sub class	:	Branchiopoda
Ordo	:	Anostraca
Famili	:	Artemidae
Genus	:	Artemia
Spesies	:	<i>Artemia salina Leach</i>

(Chalik, 1985)

II.7.2. Morfologi

Udang yang hidup di air laut ditemukan secara alamiah pada delapan puluh habitat di lima benua. *Artemia* tidak dapat bertahan hidup pada suhu kurang dari 6°C atau lebih dari 35°C. Berbeda dengan *Artemia* dewasa telurnya yang kering dapat lebih bertahan terhadap perubahan suhu. Telur *Artemia salina Leach* berbentuk bulat dan berwarna coklat dengan diameter antara 201,2 – 241,5 mikron. Telur *Artemia salina Leach* dapat

bertahan hidup sampai sepuluh tahun apabila penyimpanan dilakukan ditempat yang kering dan dingin. Telur *Artemia salina* Leach yang telah menetas menjadi nauplii berbentuk oval dan mempunyai satu mata dalam bentuk pigmen yang terletak ditengah bagian kepala dan peka terhadap sinar. Temperatur yang umum digunakan untuk penetasan adalah antara 20 – 35 °C, sedangkan oksigen terlarut yang diperlukan adalah 2 – 8 ppm. Pertumbuhan *Artemia salina* Leach dipengaruhi oleh suhu, salinitas, pH, dan oksigen. *Artemia salina* Leach merupakan binatang yang bersifat herbivora, di alam makanannya berupa plankton, ragi, dan bakteri. *Dunaliella viridis*, *Platymonas*, *Stephanopetra oracillus*, dan *chlamydomonas* adalah alga yang cocok sebagai makanan untuk *Artemia salina* Leach. Daya tahan *Artemia* terhadap perubahan kandungan ion ion kimia dalam air laut sangat tinggi melebihi hewan hewan bersel banyak. (Chalik, 1985; Disukresno, 1983).

II.7.3.Reproduksi dan daur hidup

Dalam kehidupan *Artemia salina* Leach dikenal dua macam reproduksi. Pertama secara *ovovivipar* yaitu telur yang keluar dari induknya sudah berupa burayak atau larva (naupilius) jadi sudah langsung hidup sebagai *Artemia* muda. Kedua secara *ovvipar* yaitu telur yang keluar dari induknya berupa telur yang bercangkang untuk menjadi banyak harus melalui penetasan terlebih dahulu. (Mudjiman, 1989; Chalik, 1985).

II.7.4.Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)

Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) adalah suatu metoda bioassay sederhana dan mudah untuk menguji bioaktivitas suatu senyawa dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach. Fungsi metode BSLT adalah untuk mengetahui efek toksisitas suatu senyawa. Metode BSLT sering digunakan karena proses pengamatan cepat, sederhana, organisme yang digunakan mudah diperoleh, tidak memerlukan alat dan ketrampilan khusus, tidak membutuhkan laboratorium khusus, jumlah sampel yang digunakan sedikit dan relatif lebih murah. Metode BSLT ini sering digunakan antara lain : untuk menganalisis residu pestisida, untuk menganalisis senyawa bersifat sitotoksik, untuk skrining awal terhadap senyawa yang diduga berkhsiat sebagai anti tumor dan untuk anestesik.

II.8. Penyakit Kanker

Kanker adalah penyakit akibat pertumbuhan tidak normal dari sel-sel jaringan tubuh yang berubah menjadi sel kanker dalam perkembangannya. Sel-sel kanker ini dapat menyebar ke bagian tubuh lainnya sehingga dapat menyebabkan kematian. Kanker sering dikenal oleh masyarakat sebagai tumor, padahal tidak semua tumor adalah kanker. Tumor adalah segala benjolan tidak normal atau abnormal yang bukan radang (Anonim, 2005).

Tumor dibagi dalam dua golongan, yaitu tumor jinak dan tumor ganas. Kanker adalah istilah umum untuk semua jenis tumor ganas. Sel

tumor pada tumor jinak bersifat tumbuh lambat, sehingga tumor jinak pada umumnya tidak cepat membesar. Sel kanker mendesak jaringan sehat sekitarnya secara serempak sehingga terbentuk simpai (serabut pembungkus yang memisahkan jaringan tumor dari jaringan sehat). Oleh karena bersimpai maka pada umumnya tumor jinak mudah dikeluarkan dengan cara operasi (Anonim, 2005).

Sel tumor pada tumor ganas (kanker) tumbuh cepat, sehingga tumor ganas pada umumnya cepat menjadi besar. Sel kanker tumbuh menyusup ke jaringan sehat sekitarnya, sehingga dapat digambarkan seperti keping dengan kaki-kakinya mencengkeram alat tubuh yang terkena. Sel kanker dapat juga membuat anak sebar (metastasis) ke bagian alat tubuh lain yang jauh dari tempat asalnya melalui pembuluh darah dan pembuluh getah bening dan tumbuh kanker baru di tempat lain. Penyusupan sel kanker ke jaringan sehat pada alat tubuh lainnya dapat merusak alat tubuh tersebut sehingga fungsi alat tersebut menjadi terganggu (Anonim, 2003).

Robbins (1999) menyatakan bahwa kanker terjadi akibat kegagalan dalam koordinasi fungsi gen yang diperlukan dalam proses proliferasi dan diferensiasi sel (merupakan penyakit genetik). Penelitian terhadap gen yang berhubungan dengan fungsi tersebut pada kanker, saat ini telah banyak dilakukan seperti: gen BRCA1, P53, dan Bcl-2 yang semuanya terdapat di dalam inti sel. Menurut Yusuf (2004) kanker adalah suatu pertumbuhan sel yang menyimpang dari pola awal dan mempunyai kecepatan pertumbuhan yang lebih besar daripada sel normal.

Penyimpangan dari pertumbuhan ini diakibatkan oleh adanya ekspresi gen yang tidak terkendalikan oleh sistem yang ada. Gen yang menyebabkan kanker tersebut dinamakan onkogen, yang berarti gen yang menyebabkan terjadinya kanker.

Menurut Sofyan *dalam* Nurdin (2005) sel kanker telah kehilangan sifat apoptosis, yaitu kemampuan untuk membunuh sel itu sendiri, sehingga sel terus bertambah. Hal ini terjadi karena mutasi atau perubahan genetik sel-sel tubuh yang menjadi sel kanker. Banyak hal yang diduga menjadi pemicu terjadinya mutasi gen antara lain radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh, dan adanya virus tertentu yang menginvasi sel tubuh.

Jaringan kanker tumbuh secara otonom (pengaturan sendiri), bersifat menyusup tanpa batas, dan merusak. Pembentukan kanker terjadi sebagai proses bertahap majemuk. Tahap-tahap yang paling penting adalah: tahap inisiasi (adanya perubahan DNA), periode laten (perubahan morfologi sel) dan tahapan manifestasi (dengan cara invasi dan metastase) (Schunack, *et. al.*, 1983).

Menurut Schneider *dalam* Rossy (2005) proses terjadinya kanker atau karsinogenesis (Gambar 10) dibagi menjadi empat tahap yaitu:

1. Tahap inisiasi

Tahap inisiasi merupakan tahap pertama dari karsinogenesis dimana terjadi proliferasi yang tidak normal dari suatu sel untuk pertama kalinya. Tahap ini biasa disebabkan oleh pembentukan metabolit

reaktif yang mampu berikatan secara kovalen dengan DNA sehingga menyebabkan terjadinya mutasi DNA.

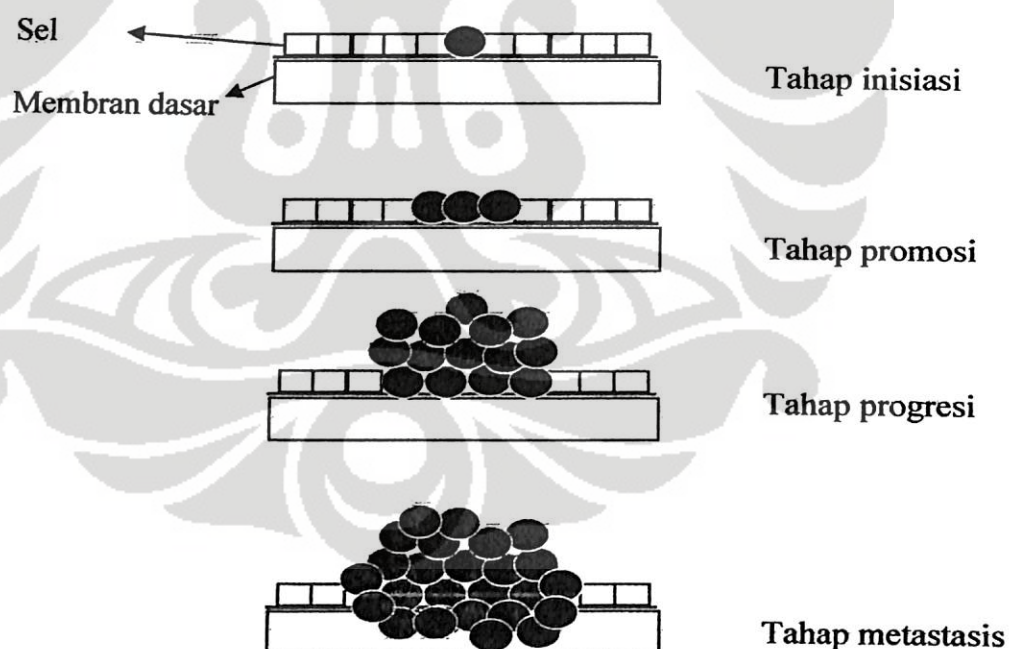
2. Tahap promosi

Pada tahap ini sel mengalami pertumbuhan menjadi suatu koloni kecil yang belum ganas.

3. Tahap progresi

Perubahan genetik mendorong pembentukan koloni sel yang lebih besar dengan pertumbuhan yang lebih cepat, pada akhirnya seluruh populasi sel telah menjadi ganas.

4. Tahap metastasis Tahap ini meliputi beberapa langkah, yaitu pemisahan sel kanker dari sel tumor induk, masuknya sel kanker ke sistem sirkulasi dan penyerangan pada permukaan dari jaringan



Gambar 11. Tahapan terjadinya kanker (Schneider dalam Rossy, 2005)

Transformasi sel menjadi kanker adalah transformasi sel menghasilkan sel-sel ganas dengan sifat dan perilaku yang berbeda dari sel normal. Perbedaan sifat yang terjadi berupa:

1. Perubahan morfologi

Sel-sel yang mengalami transformasi kerap kali memiliki bentuk yang jauh lebih bundar dari sel normal.

2. Peningkatan densitas sel

Sel-sel yang mengalami transformasi sering membentuk lapisan majemuk sedangkan sel-sel normal biasanya membentuk lapisan tunggal.

3. Kehilangan inhibisi kontak gerakan

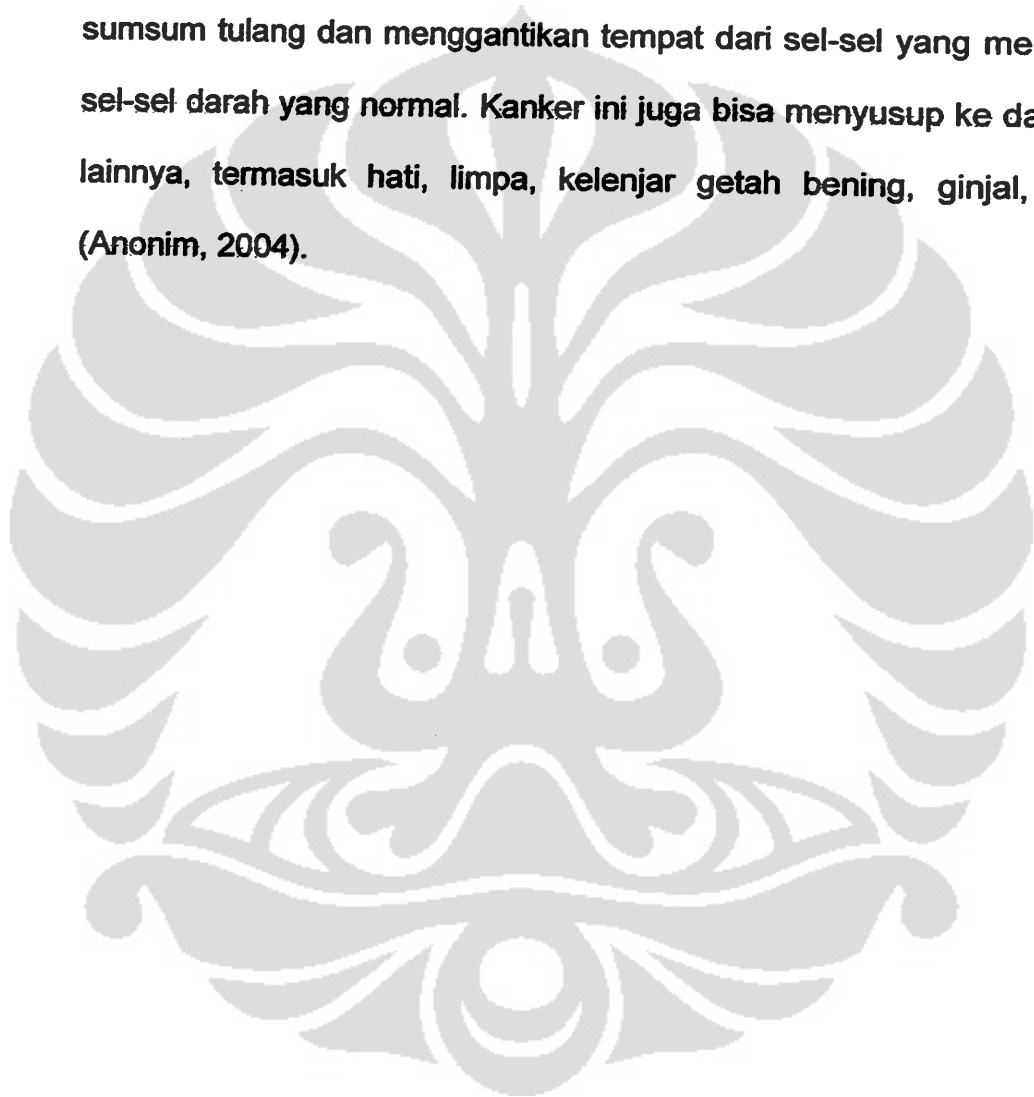
Sel-sel yang mengalami transformasi tumbuh melebihi pertumbuhan sel lainnya, sedangkan sel normal akan berhenti tumbuh.

4. Berbagai ragam perubahan biokimiawi

Sel-sel mengalami peningkatan kecepatan glikolisis dan perubahan permukaan sel (misalnya perubahan dalam komposisi glikoprotein) serta sekresi enzim-enzim protease tertentu (Schneider dalam Rossy, 2005).

Leukemia merupakan penyakit kanker yang terjadi pada sel-sel darah. Sel-sel darah pada mulanya berasal dari satu jenis sel yang disebut sel induk (*stem sel*). *Stem sel* akan berkembang menjadi sel darah merah, sel darah putih dan keping-keping darah (Patmini, 2004). *Leukemia* terjadi jika proses pematangan dari *stem sel* menjadi sel darah putih mengalami

gangguan dan menghasilkan perubahan ke arah keganasan. Perubahan tersebut seringkali melibatkan penyusunan kembali bagian dari kromosom. Penyusunan kembali kromosom (translokasi kromosom) mengganggu pengendalian normal dari pembelahan sel, sehingga sel membelah tak terkendali dan menjadi ganas, dan akhirnya sel-sel tersebut menguasai sumsum tulang dan menggantikan tempat dari sel-sel yang menghasilkan sel-sel darah yang normal. Kanker ini juga bisa menyusup ke dalam organ lainnya, termasuk hati, limpa, kelenjar getah bening, ginjal, dan otak (Anonim, 2004).



III. METODE PENELITIAN

III.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama empat bulan yaitu dari bulan Juli hingga bulan November 2007, bertempat di Laboratorium Bahan Alam Pangan dan Farmasi Pusat Penelitian Kimia LIPI PUSPIPTEK Serpong Tangerang dan Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam, Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung.

III.2. Bahan dan Alat

III.2.1. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi senyawa asam 2-hidroksipikolinat, L-etil-serin-ester hidroklorida, asam heptanoat, asam oktanoat, N,N'-disikloheksilkarbodiimida (DCC), 4-dimetilaminopiridin (DMAP), piridin, natrium sulfat anhidrat, diklorometan, kloroform, plat kromatografi lapis tipis, CDCl_3 , metanol, pelet KOH, silika gel (70-230 mesh), n-heksan, etil asetat, aquades, larutan HCl 2%, larutan NaOH 1%, dan bahan-bahan yang digunakan dalam uji sitotoksisitas antara lain: telur udang *Artemia salina* leach, media air laut, larutan dimetil sulfoksida (DMSO).

III.2.2. Alat

III.2.2.1. Alat alat Proses :

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas yang umum digunakan di laboratorium kimia seperti: labu leher dua, gelas piala, tabung reaksi, gelas ukur, corong pisah, dan batang pengaduk. Alat-alat lainnya yang digunakan adalah seperangkat alat refluks , seperangkat alat destilasi, pengaduk magnet dan kelengkapannya, termometer, *hot plate stirrer with probe* (temperatur kontrol).

III.2.2.2. Alat Penunjang :

Alat yang digunakan sebagai alat penunjang adalah : evaporator vakum, spektrofotometer FT-IR Shimadzu 2010A, *Liquid Chromatography mass spectrometer* (LC-MS), spektrometer *Nuclear Magnetic Resonance* proton dan karbon (^1H NMR dan ^{13}C NMR) JEOL ECA NMR 500 MHz, sumuran (*wall plate*), pipet mikro, inkubator, dan *microplate*.

III.3. Prosedur Penelitian

III.3.1. Prosedur umum (Anderson dalam Widodo, 1998 ; Hanafi, 1995).

Alat-alat gelas maupun pelarut yang digunakan dalam proses sintesis harus bebas air. Semua alat gelas sebelum digunakan dikeringkan terlebih dahulu dalam oven pada suhu $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 1 jam. Semua pelarut teknis yang digunakan dalam analisis dengan

menggunakan KLT dan pemurnian hasil sintesis dengan kromatografi kolom harus didestilasi terlebih dahulu. Penguapan pelarut dalam proses pemurnian menggunakan evaporator vakum dengan pemanas air pada suhu sekitar 50 °C.

Semua reaksi dilakukan dibawah kondisi gas nitrogen dengan cara mengisi balon dengan gas N₂, sebelumnya zat yang telah dimasukkan ke dalam labu bulat divakum terlebih dahulu selama kurang lebih 30 menit kemudian pelarut ditambahkan melalui septum dengan menggunakan siring. Semua pengadukan reaksi dilakukan dengan menggunakan *magnetic stirrer*.

Analisis pendahuluan produk hasil sintesis diamati dengan menggunakan KLT. Spot yang terbentuk diamati dengan menggunakan lampu ultraviolet pada $\lambda = 254$ nm. Produk yang dihasilkan dapat diketahui dengan membandingkan nilai R_f antara bahan awal/pereaktan dengan hasil reaksi.

KLT dilakukan pada pelat KLT silika gel Merck GF 254 dengan ketebalan 0,25 mm. Kromatografi kolom dikerjakan dengan menggunakan silika gel Merck dengan ukuran 70–230 mesh, dan menggunakan fasa gerak yang sesuai.

III.3.2. Sintesis senyawa β -hidroksipikolinil-serin-etil-ester

Pembentukan senyawa β -hidroksipikolinil-serin-etil-ester dilakukan dengan mereaksikan asam 2-hidroksipikolinat sebanyak 1,669 g (12 mmol) dengan L-serin-etil-ester hidroklorida sebanyak 1,0176 g (6 mmol)

di dalam labu dua leher, ke dalamnya ditambahkan aktivator DCC sebanyak 1,3596 g (6,6 mmol) dan katalisator DMAP sebanyak 0,146 g (1,2 mmol), kemudian ditambahkan pelarut piridin sebanyak 5 mL melalui septum. Reaksi dibiarkan berlangsung pada suhu 55 °C selama 24 jam sambil diaduk dengan kecepatan konstan menggunakan *magnetic stirrer*.

Penggunaan aktivator DCC akan menghasilkan produk samping disikloheksil urea (DCU) yang berbentuk bubuk dan cukup mengganggu dalam proses pemurnian, maka setelah reaksi selesai ditambahkan air kemudian disaring. Endapan yang ada pada kertas saring dicuci beberapa kali dengan air. Filtrat yang dihasilkan kemudian diekstraksi dengan 25 mL diklorometan sebanyak 3 kali. Air yang masih tersisa dihilangkan dengan cara menambahkan natrium sulfat anhidrat, selanjutnya dilakukan proses pemurnian dengan menggunakan kromatografi kolom silika gel dengan menggunakan eluen n-heksan : etilasetat mulai dari n-heksan 100%, dilanjutkan dengan n-heksan : etilasetat = 90% : 10%, n-heksan : etilasetat = 80% : 20%, n-heksan : etilasetat = 70% : 30%, n-heksan : etilasetat = 60% : 40%, sampai perbandingan n-heksan : etilasetat = 50% : 50%, masing-masing sebanyak 150 mL. Tiap fraksi yang diperoleh kemudian diuji dengan KLT.

Senyawa yang memiliki nilai Rf yang sama kemudian digabungkan dan pelarutnya diuapkan dengan menggunakan evaporator vakum. Senyawa produk yang diperoleh kemudian divakum beberapa saat untuk menghilangkan pelarut yang mungkin tersisa, lalu ditimbang dan dihitung

rendemennya. Identifikasi struktur dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer FT-IR, spektrometer LC-MS dan spektrometer NMR (^1H -NMR dan ^{13}C -NMR).

III.3.3. Sintesis senyawa β -hidroksipikolinil-serin-etil-oktanoil-ester

Sintesis senyawa β -hidroksipikolinil-serin-etil-oktanoil-ester dilakukan dengan mereaksikan senyawa β -hidroksipikolinil-serin-etil-ester sebanyak 0,202 g (0,4 mmol) dengan asam oktanoat sebanyak 0,2 mL (0,6 mmol), DCC 0,4944 g (1,2 mmol), DMAP 0,048 g (0,2 mmol), dan ditambah 5 mL pelarut kloroform di dalam labu dua leher. Reaksi dibiarkan berlangsung pada suhu ruang selama 4 jam sambil diaduk dengan kecepatan konstan menggunakan *magnetic stirrer*.

Setelah reaksi selesai, pelarut diuapkan dengan menggunakan evaporator vakum. Kristal yang terbentuk dicuci dengan n-heksan untuk memisahkan produk dengan hasil samping disikloheksil urea, kemudian diuapkan untuk menghilangkan pelarutnya dan dimurnikan dengan menggunakan kromatografi kolom silika gel dengan fasa gerak eluen campuran n-heksan : etilasetat mulai dari n-heksan 100%, dilanjutkan dengan n-heksan : etilasetat = 90% : 10%, n-heksan : etilasetat = 80% : 20%, sampai perbandingan n-heksan : etilasetat = 70% : 30%, masing-masing sebanyak 30 mL. Fraksi-fraksi yang diperoleh selanjutnya diuji dengan kromatografi lapis tipis. Fraksi-fraksi yang memiliki nilai R_f yang sama kemudian digabungkan, kemudian pelarutnya diuapkan. Senyawa produk yang diperoleh kemudian divakum beberapa saat untuk

menghilangkan pelarut yang masih tersisa, lalu ditimbang dan dihitung rendemennya. Identifikasi struktur dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer FT-IR, spektrometer LC-MS dan spektrometer NMR (^1H -NMR dan ^{13}C -NMR).

III.3.4. Sintesis senyawa β -hidroksipikolinil-serin-etil-heptanoil-ester

Sintesis senyawa β -hidroksipikolinil-serin-etil-heptanoil-ester dilakukan dengan mereaksikan senyawa 2-hidroksipikolinil-etil-serin-ester sebanyak 0,202 g (0,4 mmol) dengan asam heptanoat sebanyak 0,16 mL (0,6 mmol), DCC 0,4944 g (1,2 mmol), DMAP 0,048 g (0,2 mmol), dan ditambah 5 mL pelarut kloroform di dalam labu dua leher. Reaksi dibiarkan berlangsung pada suhu ruang selama 4 jam sambil diaduk dengan kecepatan konstan menggunakan *magnetic stirrer*.

Setelah reaksi selesai, pelarut diuapkan dengan menggunakan evaporator vakum. Kristal yang terbentuk dicuci dengan n-heksan untuk memisahkan produk dengan hasil samping disikoloheksil urea. Kemudian diuapkan untuk menghilangkan pelarutnya dan dimurnikan dengan menggunakan kromatografi kolom silka gel dengan fasa gerak eluen campuran n-heksan : etilasetat mulai dari n-heksan 100%, dilanjutkan dengan n-heksan : etilasetat = 90% : 10%, n-heksan : etilasetat = 80% : 20%, sampai perbandingan n-heksan : etilasetat 70% : 30%, masing-masing sebanyak 30 mL. Fraksi-fraksi yang diperoleh selanjutnya diuji dengan kromatografi lapis tipis. Fraksi-fraksi yang memiliki nilai R_f yang sama kemudian digabungkan, kemudian pelarutnya diuapkan. Senyawa

produk yang diperoleh kemudian divakum beberapa saat untuk menghilangkan pelarut yang masih tersisa, lalu ditimbang dan dihitung rendemennya. Identifikasi struktur dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer FT-IR, spektrometer LC-MS dan spektrometer NMR (^1H -NMR dan ^{13}C -NMR).

III.3.5. Identifikasi Struktur Molekul

III.3.5.1. Identifikasi struktur molekul dengan menggunakan spektrofotometer FT-IR

Senyawa hasil sintesis yang telah dimurnikan diukur dalam bentuk pelet NaCl menggunakan spektrofotometer FT-IR.

III.3.5.2. Identifikasi struktur molekul dengan menggunakan spektrometer LC-MS

Senyawa hasil sintesis yang telah dimurnikan dilarutkan dalam methanol PA kemudian diambil sebanyak 20 μL , lalu diinjeksikan ke dalam alat spektrometer LC-MS.

III.3.5.3. Identifikasi struktur molekul dengan menggunakan spektrometer NMR

Senyawa hasil sintesis yang telah dimurnikan dilarutkan dalam pelarut CDCl_3 yang mengandung TMS, kemudian dimasukkan ke dalam tabung NMR dengan tinggi larutan 4 cm, kemudian dimasukkan ke dalam alat NMR.

III.3.6. Uji Toksisitas Brine shrimp lethality Test

III.3.6.1. Penetasan telur *Artemia salina* Leach

Ke dalam sebuah kotak yang telah terbagi dua dengan sekat berlubang dimasukan air laut secukupnya. Telur udang ditambahkan pada salah satu sisi kotak tersebut kira kira 20 mg, lalu sisi ini ditutup dengan aluminium foil. Pada sisi yang tidak tertutup diberi penyinaran dengan lampu TL 20 Watt sehingga telur udang menetas dengan sempurna dan dibiarkan selama 48 jam.

III.3.6.2. Larutan uji

Sampel pada uji Brine Shrimp Lethality Test ditimbang dengan saksama lebih kurang 4 mg, sampel kemudian dilarutkan ke dalam 2,0 mL air laut yang sudah disaring (2000 ppm), dilakukan pengenceran hingga diperoleh konsentrasi 1000,800,dan 400 ppm, jika sampel sukar larut dapat dibantu dengan dimetil sulfoksida (DMSO) 1% sebanyak 10 μ L.

III.6.3. Uji bloaktifitas

1. Dipipet 100 μ L air laut yang berisi 10 – 12 larva udang *Artemia salina* Leach, yang berumur 48 jam, ditambahkan 100 μ L larutan sampel untuk masing masing konsentrasi sehingga konsentrasi akhir untuk tiap tiap wadah 1000 ppm, 500 ppm, 400 ppm, 200 ppm.
2. Setiap konsentrasi dibuat 3 kali pengulangan (triplo), sebagai larutan kontrol dibuat tanpa larutan sampel, wadah percobaan disimpan di bawah lampu TL 20 Watt.

3. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam dengan melihat jumlah larva udang yang mati dari masing masing wadah, kemudian dicari nilai LC_{50} .
4. Analisis data hasil pengujian Brine Shrimp Lethality Test dilakukan dengan cara jumlah larva yang mati dan yang masih hidup, kemudian dihitung tingkat kematian atau mortalitas (%) dengan membandingkan antara jumlah yang mati dibagi dengan jumlah total larva. Sampel dikatakan aktif apabila nilai $LC_{50} < 1000$.

III.3.7. Uji Sitotoksisitas pada sel Kanker *Murine leukemia* P 388 (Sahidin, *et al.* 2005)

Kultur sel kanker *Murine leukemia* P388 ditumbuhkan dalam media RPMI 1640 yang telah ditambahkan *Fetal Bovine Serum* (FBS), penisilin dan streptomisin, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Sel yang telah tumbuh kemudian dimasukkan ke dalam sumuran (*wall plate*) dengan kerapatan 3×10^4 sel per cm^{-3} , dan kemudian ditambahkan senyawa hasil sintesis yang telah dimurnikan dengan seri kadar tertentu. Senyawa yang ditambahkan, sebelumnya dilarutkan dalam DMSO, kemudian ditambahkan PBS (*phosporic buffer solution* pH 7,30 – 7,65) dan kontrol yang dipakai adalah sel yang dilarutkan dalam DMSO. Sel diinkubasi selama 48 jam, kemudian ditambahkan reagen MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida]. Inkubasi dilanjutkan selama 4 jam,

kemudian ditambahkan SDS (sodium dodesil sulfat) dan diinkubasi kembali selama 24 jam.

Perubahan warna dari MTT kuning menjadi formazan ungu di dalam mitokondria sel sel yang masih hidup dapat dikuantifikasi pada panjang gelombang (λ) = 500 – 600 nm dengan spektrofotometer. Nilai IC_{50} dilihat dari grafik hubungan antara respon viabilitas sel dengan konsentrasi senyawa uji.



IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

IV.1. Sintesis Senyawa Analog UK-3A

Sintesis senyawa analog UK-3A, β -hidroksipikolinil serin etil heptanoil ester (PSEHE) dan β -hidroksipikolinil serin etil oktanoil ester (PSEOE) dilakukan melalui dua tahap reaksi kimia, yang pertama reaksi amidasi, yaitu pembentukan senyawa β -hidroksipikolinil serin etil ester (PSEE) dan kedua reaksi esterifikasi, yaitu pembentukan senyawa PSEHE dan PSEOE. Hasil sintesis dimurnikan dengan penyaringan, ekstraksi pelarut, evaporasi putar vakum, kromatografi kolom silika gel, dan dilakukan pula rekristalisasi untuk PSEE. Analisis pendahuluan dilakukan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT), kemudian senyawa hasil pemisahan diidentifikasi dengan menggunakan spektrofotometer *Fourier Transform Infra Red* (FT-IR), *Liquid Chromatography-Mass Spectrometer* (LC-MS), spektrometer $^1\text{H-Nuclear Magnetic Resonance}$ ($^1\text{H-NMR}$) dan $^{13}\text{C-Nuclear Magnetic Resonance}$ ($^{13}\text{C-NMR}$). Hasil spektrum FT-IR digunakan untuk mengidentifikasi gugus-gugus fungsi yang terdapat dalam molekul, spektrum LC-MS digunakan untuk mengetahui berat molekul dan kemurnian senyawa yang dihasilkan, dan spektrum $^1\text{H-NMR}$ serta spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ digunakan untuk mengidentifikasi struktur molekul yang terbentuk dengan cara menentukan jumlah dan posisi proton dan karbon dalam senyawa tersebut.

Penelitian sintesis senyawa-senyawa analog UK-3A terdahulu diperoleh kondisi optimum reaksi dengan menggunakan DCC (*N,N*-

disikloheksilkarbodiimida) dan DMAP (4-dimetilaminopiridin) sebagai aktivator dan katalis untuk reaksi pembentukan amida dan ester yang memberikan rendemen lebih tinggi dibandingkan dengan penggunaan beberapa aktivator dan katalis lainnya, sehingga kondisi reaksi tersebut digunakan untuk sintesis senyawa analog UK-3A pada penelitian ini. Penggabungan aktivasi karboksil oleh DCC dan katalis DMAP merupakan suatu metode yang baik untuk mengaktivasi asam karboksilat yang bereaksi dengan alkohol maupun amina pada temperatur yang tidak terlalu tinggi (Rosalina, 1999).

Analisis pendahuluan terbentuknya produk dilakukan dengan KLT. KLT memiliki keuntungan yaitu waktu yang diperlukan relatif cepat dan diperoleh pemisahan yang baik. Kromatografi ini juga berguna untuk mencari pelarut untuk kromatografi kolom, menganalisis fraksi-fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom, mengetahui arah reaksi, serta mengidentifikasi dan mengisolasi senyawa murni skala kecil (Markham, 1988 dalam Mulyadi, 1995). Pemurnian senyawa produk dilakukan dengan metode kromatografi kolom menggunakan campuran n-heksana dan etil asetat sebagai fase gerak. Pemilihan pelarut ini didasarkan pada analisis pendahuluan menggunakan KLT, karena pada dasarnya KLT merupakan bentuk kromatografi kolom terbuka yang terelusi secara *ascending* dengan gaya kapiler (Khopkar, 2003). Berdasarkan analisis produk dengan KLT menggunakan kedua campuran pelarut tersebut diperoleh pemisahan produk yang baik dengan spot yang bulat tanpa adanya *tailing*. Penelitian terdahulu

menggunakan campuran kloroform dan metanol sebagai fase gerak dalam pemisahan senyawa produk analog UK-3A, namun pada penelitian ini digunakan campuran n-heksana dan etil asetat dengan pertimbangan-pertimbangan :

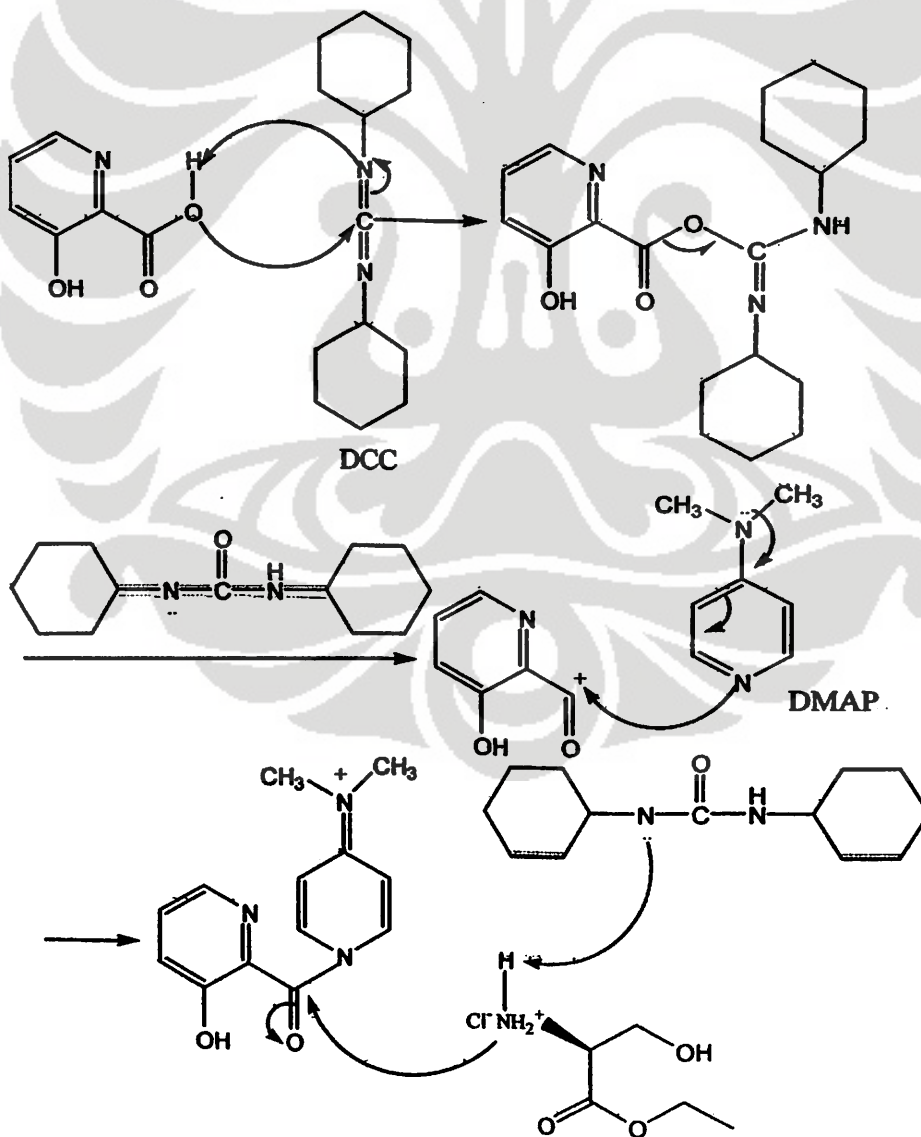
- a. Senyawa produk cenderung bersifat kurang polar sehingga akan terelusi dengan baik menggunakan n-heksana dan etil asetat yang nonpolar-semipolar dibandingkan kloroform : metanol yang semipolar-polar.
- b. DCU (*N,N*-disikloheksilurea), pereaksi L-serin etil ester hidroklorida dan asam karboksilat yang digunakan lebih sukar larut dalam n-heksana dan etil asetat sehingga lebih mudah dipisahkan dari produk.
- c. Komponen-komponen campuran terpisah lebih baik menggunakan fase gerak n-heksana dan etil asetat, yang ditunjukkan oleh kromatogram yang menunjukkan lebih banyak spot.
- d. Eluen yang terlalu polar akan terikat dalam silika gel yang polar sehingga elusi kurang baik.

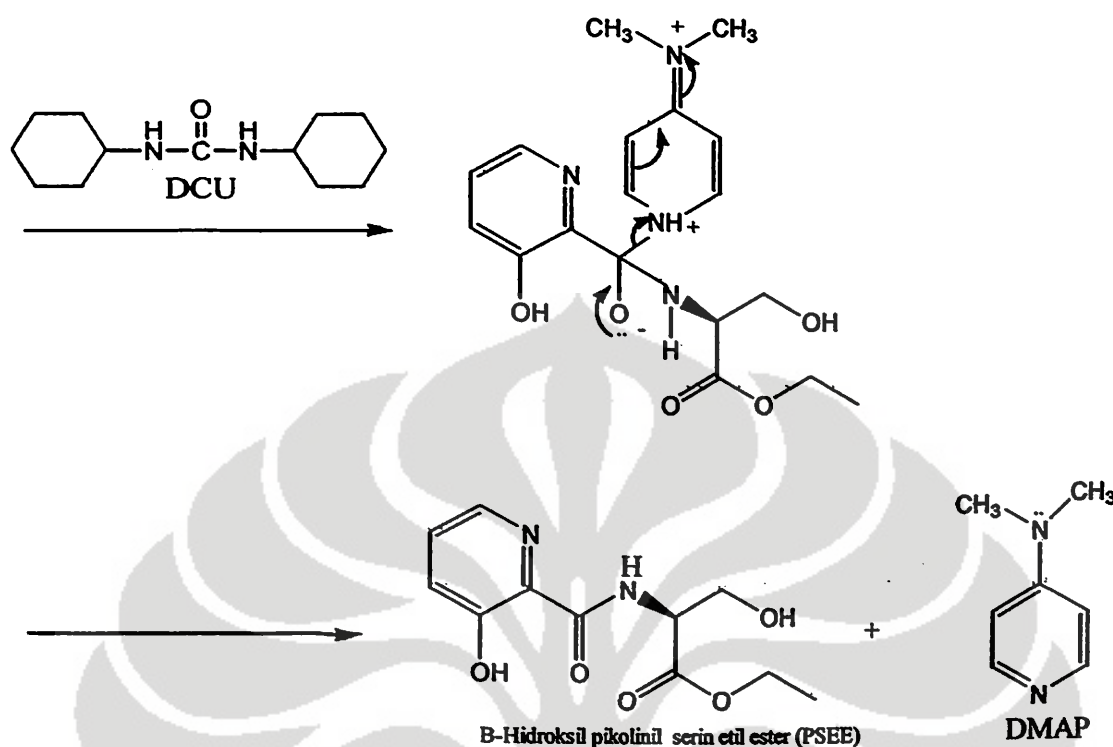
Reaksi pembentukan amida dan ester pada penelitian ini menggunakan alat-alat gelas dan reaktan/pelarut yang bebas air, juga dilakukan dibawah kondisi gas nitrogen yang bertujuan untuk membebaskan air dalam lingkungan reaksi yang dapat mengganggu reaksi pembentukan produk. Air dapat menyebabkan reaksi balik ke sisi pereaksi sehingga dapat mengurangi rendemen yang dihasilkan. Penggunaan pelarut cukup hingga dapat melarutkan semua bahan reaksi, karena jika pelarut yang digunakan

terlalu banyak akan menurunkan konsentrasinya, sehingga menurunkan pula produk yang dihasilkan.

IV.1.1. Sintesis senyawa β -hidroksipikolinil serin etil ester

Sintesis senyawa β -hidroksipikolinil serin etil ester (PSEE) dilakukan dengan mereaksikan L-serin etil ester hidroklorida dengan asam β -hidroksipikolinat menggunakan aktivator DCC, katalis DMAP dan pelarut piridin pada suhu 55°C . Reaksi yang terjadi mengikuti mekanisme sebagai berikut :





Gambar 12. Mekanisme reaksi pembentukan PSEE (Widodo, 1998; Carey & Sunberg, 1991)

Piridin dipilih sebagai pelarut dalam sintesis senyawa PSEE, karena pelarut ini bersifat polar dan dapat melarutkan dengan sempurna pereaksi-pereaksi serta katalis dan aktivator dalam reaksi sehingga membentuk larutan homogen. Piridin mudah mengikat air yang tidak diinginkan dalam lingkungan reaksi, sehingga sebelum digunakan dimurnikan terlebih dahulu menggunakan KOH pelet dan destilasi (Hanafi, 1995).

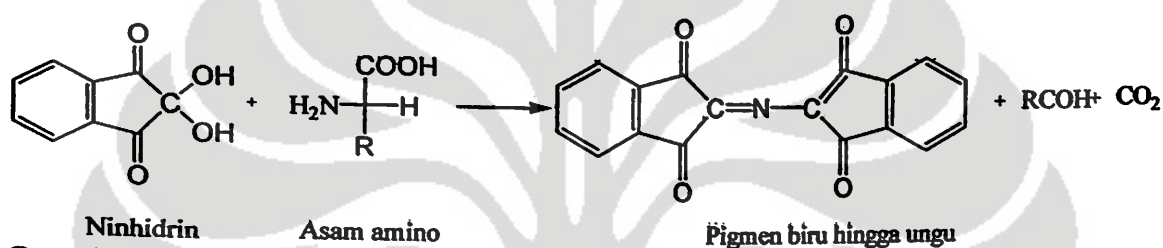
Reaksi dapat berjalan jika telah tercapai energi aktivasi reaksi. Penggunaan suhu 55°C dimaksudkan untuk tercapainya suhu optimum agar tercapainya energi aktivasi. Reaksi dilakukan selama 24 jam yang diharapkan produk telah terbentuk optimal. Laju reaksi bergantung pada banyak variabel diantaranya temperatur, pelarut, konsentrasi pereaksi, dan struktur pereaksi (Fessenden dan Fessenden, 1986).

Hasil reaksi diperoleh kristal putih agak kekuningan seperti jarum. DCC yang masih tersisa ditambahkan air agar diubah menjadi DCU. DCU tidak larut dalam pelarut-pelarut yang digunakan dalam pemisahan dan pemurnian sehingga mudah dipisahkan dengan cara penyaringan.

Analisis pendahuluan terbentuknya produk dilakukan dengan KLT silika gel dengan fase gerak n-heksana : etil asetat (2:1) menggunakan penampak spot lampu UV pada 254 nm dan 365 nm serta pereaksi warna ninhidrin, diperoleh spot baru dominan berwarna ungu dengan $R_f = 0,43$, sedangkan L-serin-metil ester hidroklorida maupun asam β -hidroksipikolinat sebagai pembanding tidak bergerak naik ($R_f = 0$) pada kedua campuran fase gerak tersebut karena kedua pereaksi sangat polar (Lampiran 3.a). Spot baru yang terbentuk dengan nilai R_f 0,43 adalah produk PSEE yang dibuktikan dengan analisis lanjutan menggunakan metode spektroskopi LC-MS, FT-IR, $^1\text{H-NMR}$, dan $^{13}\text{C-NMR}$. PSEE kurang polar dibandingkan pereaksinya yang disebabkan bertambahnya rantai karbon dan berat molekul oleh terbentuknya amida, sehingga memiliki R_f yang lebih tinggi. Spot-spot lain yang tidak dominan merupakan pengotor dalam produk (Lampiran 3.a) sehingga dipisahkan dari produk PSEE dengan ekstraksi pelarut, kromatografi silika gel dan rekristalisasi.

Spot L-serin etil ester hidroklorida tidak terlihat pada lampu UV 254 nm dan 365 nm sehingga digunakan pereaksi warna ninhidrin. Ninhidrin secara umum digunakan untuk mendeteksi adanya asam amino atau turunannya yang masih memiliki gugus α -amino bebas. Ninhidrin dapat

bereaksi dengan gugus α -amino bebas dari asam amino membentuk senyawa biru hingga ungu. Penyemprotan ninhidrin menimbulkan warna ungu pada spot L-serin etil ester hidroklorida yang memiliki gugus α -amino bebas, namun pada spot produk senyawa PSEE tidak terjadi perubahan warna karena telah terbentuk amida pada gugus tersebut. Reaksi ninhidrin dengan asam amino dapat digambarkan sebagai berikut :



Gambar 13. Reaksi ninhidrin dengan asam amino (Pasto, 1992 dalam Arsianti, 1998).

Piridin yang memiliki titik didih cukup tinggi (115°C) sulit dipisahkan dengan cara evaporasi putar vakum sehingga pemisahannya dilakukan dengan cara ekstraksi beberapa kali dengan larutan HCl 2% dan diklorometana. Penetralkan HCl dan asam β -hidroksipikolinat yang tersisa dilakukan dengan menambahkan NaOH 1%. Piridin, DMAP, dan garam pikolinat yang bersifat polar akan masuk dalam fraksi polar, sedangkan produk ikut dalam fraksi diklorometana (nonpolar) yang dengan mudah diuapkan menggunakan evaporator putar vakum (Hanafi, 1995).

Pemurnian selanjutnya dilakukan dengan menggunakan kromatografi kolom silika gel dengan fase gerak n-heksana:etil asetat secara bertahap, dimulai dari yang nonpolar hingga semipolar. Hal ini dimaksudkan agar senyawa-senyawa turun dan terpisah dengan sempurna sesuai dengan kepolaran masing-masing sehingga diperoleh senyawa PSEE yang murni.

Fraksi-fraksi senyawa target yang dikumpulkan dan dikeringkan dengan evaporasi putar vakum diperoleh kristal putih, namun kristal tidak terbentuk dengan baik sehingga dilakukan rekristalisasi menggunakan campuran diklorometana dan n-heksana 1:1. Rekristalisasi yang dilakukan juga berguna untuk pemurnian lebih lanjut yaitu untuk memisahkan DCU yang lolos dalam pemurnian sebelumnya. DCU tidak larut dalam sedikit pelarut diklorometana dan n-heksana sehingga mudah dipisahkan dengan penyaringan maupun dekantasi. Hasil yang diperoleh berupa kristal jarum halus berwarna putih.. Kristal tersebut telah dianggap murni karena hanya menunjukkan satu spot pada analisis KLT setelah pemurnian di atas. Hasil perhitungan rendemen (Lampiran 2.a) diperoleh produk PSEE sebesar 90,44 %. Faktor-faktor yang mempengaruhi hasil rendemen ini antara lain : pemilihan temperatur, konsentrasi reaktan, penggunaan katalis, pelarut, serta lamanya reaksi. Faktor-faktor lain yang dapat juga mempengaruhi yaitu adanya DCU dalam produk. DCU cukup sulit dipisahkan seutuhnya dari produk, karena dalam pelarut berlebih DCU larut sebagian sehingga masih ada DCU yang lolos dalam penyaringan maupun dalam kromatografi kolom. DCU tidak terlihat dengan penampak noda ninhidrin maupun lampu UV 254 nm dan 365 nm pada KLT dan diperkirakan spotnya tidak bulat tetapi memanjang sehingga tidak terpisah dengan baik dari produk PSEE. Persen hasil (rendemen) yang kurang optimal kemungkinan disebabkan oleh reaktan, pelarut piridin, alat, maupun lingkungan reaksi yang dipakai masih mengandung air, kontaminasi zat lain, atau adanya pembentukan produk

samping. Kristal PSEE yang diperoleh diidentifikasi lebih lanjut menggunakan analisis spektroskopi sebagai berikut :

IV.1.1.1. Analisis LC-MS

Hasil analisis menggunakan LC-MS (Lampiran 4a) diperoleh kromatogram dengan % luas area senyawa produk PSEE adalah 85,21% yang ditunjukkan oleh dua signal kromatogram dengan waktu retensi 3,4 menit yang merupakan signal dominan dan 4,8 menit yang tidak dominan , serta diperoleh spektrum massa (M^+) 254 g/mol yang merupakan berat molekul dari PSEE. Spektrometer LC-MS berbeda dengan GC-MS. LC-MS tidak memberikan data fragmentasi yang lengkap. Data spektrum senyawa yang menunjukkan keberadaan suatu molekul didukung oleh munculnya spektrum M^++1 dan M^++2 serta M^++Na . Berdasarkan data spektrum yang muncul, diperoleh M^++1 sebesar 254,8899 g/mol dan $M^++2 = 256.4024$ serta M^++Na sebesar 276,8785 g/mol. Adanya korelasi antara spektrum spektrum yang muncul menunjukkan berat molekul PSEE adalah 254 g/mol.

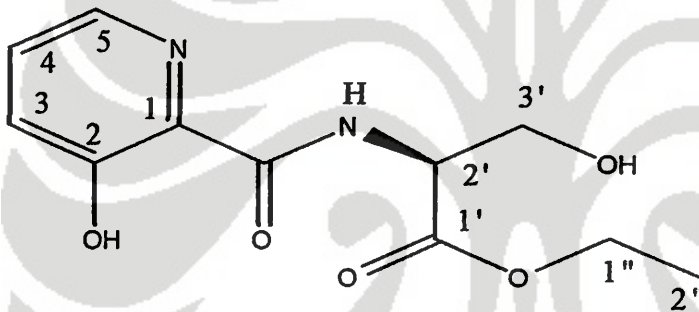
IV.1.1.2. Analisis FT-IR

Analisis pita-pita serapan senyawa PSEE yang dihasilkan dari pengukuran FT-IR (Lampiran 5a) menunjukkan adanya signal pada bilangan gelombang $\bar{\nu} = 1734 \text{ cm}^{-1}$ yang merupakan vibrasi ulur karbonil dari ester dan serapan tunggal pada $\bar{\nu} = 3199 \text{ cm}^{-1}$ merupakan vibrasi ulur NH dari amida. Vibrasi ulur OH ditunjukkan oleh serapan pada 3394 cm^{-1} . Hasil

analisis juga menunjukkan adanya tekukan NH pada 1635 cm^{-1} . Uluran CH alifatik muncul pada $2850\text{-}2966\text{ cm}^{-1}$ dan CH aromatik pada 3030 cm^{-1} .

IV.1.1.3. Analisis $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$

Hasil analisis pergeseran kimia senyawa PSEE menggunakan spektrofotometer $^1\text{H-NMR}$ (Lampiran 6a) dan $^{13}\text{C-NMR}$ (Lampiran 6b) ditunjukkan oleh Tabel 3 menggunakan panduan Gambar 14 di bawah ini :



Gambar 14. Struktur molekul senyawa PSEE

Tabel 2. Data pergeseran kimia (δ , ppm) senyawa PSEE dari spektrum $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz)

C/H	Pergeseran Kimia	
	^1H	^{13}C
1''	4,33 (q, 2H), 7,3 Hz	54,6
2''	1,32 (t, 3H), 7,3 Hz	14,3
1	-	170,0
2'	2,36 (dt, 1H), 6,7 Hz	62,5
3	4,28 (dd, 1H), 7,3 Hz 4,31 (dd, 1H), 6,7 Hz	63,4
1	-	158
2	-	131,1
3	7,38 (d, 1H), 8,5 Hz	129,2
4	7,32 (dd, 1H), 6,7 Hz	126,3
5	8,11 (d, 1H), 1,2 Hz	140,0
OH- Ph	11,71 (s, 1H)	-
OH- Serin	4,81 (d, 1H), 3,6 Hz	-
CONH	8,78 (d, 1H), 6,1 Hz	169,2

Data analisis spektrometer $^1\text{H-NMR}$ di atas dapat dijelaskan sebagai berikut : pada $\delta = 4,81$ ppm (d, 1H) adalah pergeseran kimia proton dari gugus OH serin. Pergeseran kimia pada $\delta = 1,32$ ppm (s, 3H) menunjukkan gugus metil C2" yang lebih *downfield* karena berdekatan dengan gugus ester pada posisi β . Gugus metilen C3' ditunjukkan pada $\delta = 4,31$ ppm (d, 1H) dan $\delta = 4,28$ ppm (d, 1H) yang muncul dua signal (*coupling*) oleh pergeseran kedua proton C3' dan doublet karena interaksi dengan metin disebelahnya dan *downfield* karena adanya atom oksigen yang elektronegatif pada posisi α dan amida ester pada posisi β . Gugus metin C2' ditunjukkan pada $\delta = 2,36$ ppm (dt, 1H) yang berinteraksi dengan NH amida dan metilen, muncul *downfield* karena berdekatan dengan karbonil ester dan amida pada posisi α .

Adanya gugus amida ditunjukkan oleh signal yang muncul pada $\delta = 8,78$ ppm (d, 1H) yang berasal dari 1 proton gugus amida yang berinteraksi dengan gugus metin dan muncul *downfield* karena membentuk ikatan hidrogen intermolekuler. Signal pada $\delta = 7,38$ (d, 1H, H3-Ph) , 7,32 (dd, 1H, H4-Ph) dan 8,11 ppm (d, 1H, H5-Ph) masing-masing menunjukkan adanya 1 buah proton aromatik yang terikat pada atom C-3, C-4 dan C-5 pada cincin piridin berupa *splitting* proton yang muncul doublet-doublet pada C-4 dan, kemudian doublet pada C-3 dan C-5. Signal pergeseran kimia lainnya pada $\delta = 11,71$ ppm (singlet, 1H, OH-Ph) muncul singlet akibat 1 buah proton dari gugus hidroksil yang terikat pada atom C-2 cincin piridin dan muncul

downfield karena membentuk ikatan hidrogen intramolekuler dengan gugus karbonil amida.

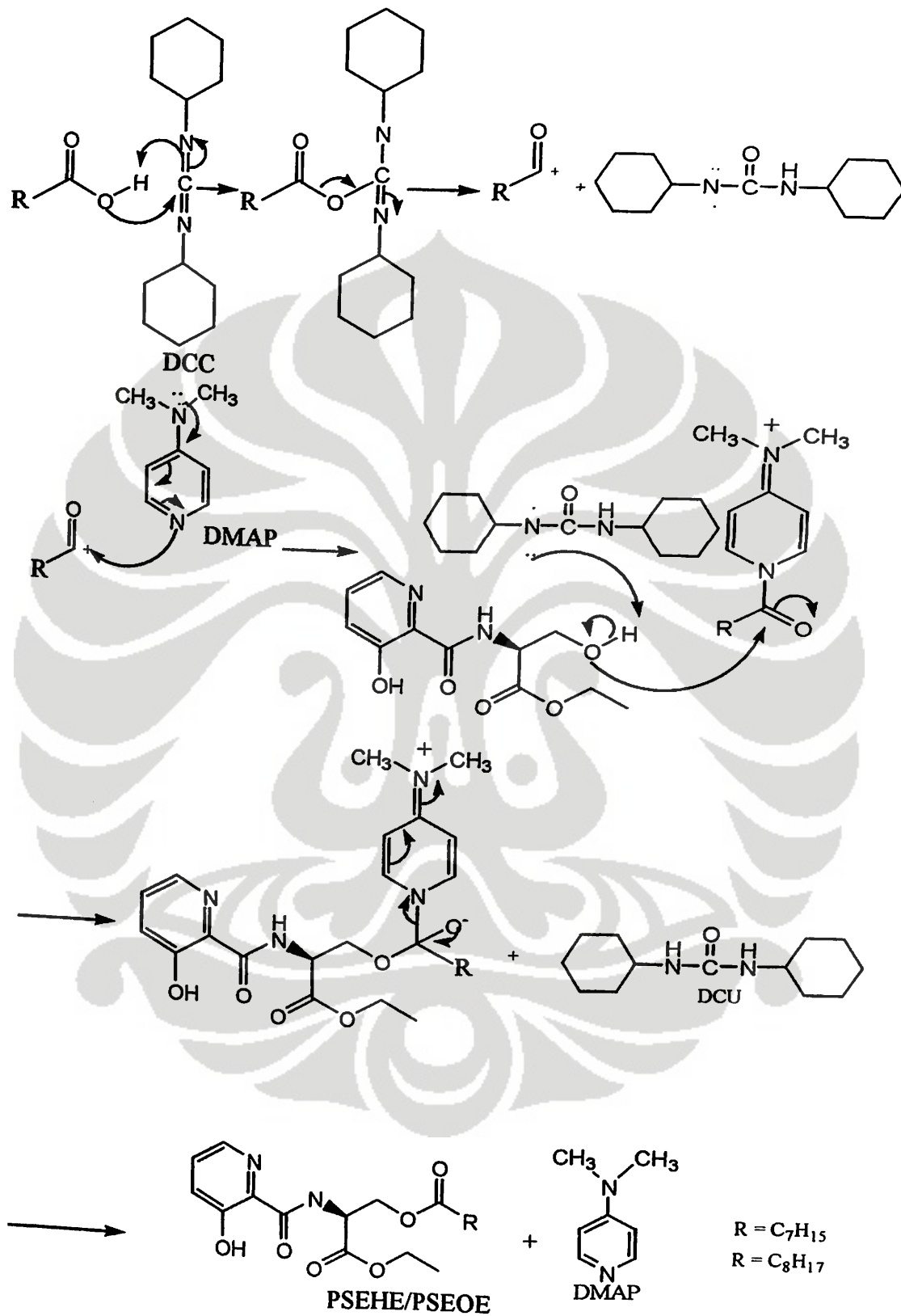
Data spektrum ^{13}C -NMR menunjukkan adanya signal-signal pergeseran kimia sebagai berikut : pada $\delta = 14,3$ ppm menunjukkan pergeseran kimia karbon metil dan $\delta = 54,6$ ppm yang menunjukkan pergeseran kimia karbon metilen yang *downfield* karena berdekatan dengan atom oksigen ester yang elektronegatif. Pergeseran pada $\delta = 63,4$ ppm menunjukkan karbon metin yang *downfield* karena berdekatan dengan atom nitrogen amida, sedangkan pada $\delta = 62,3$ ppm menunjukkan karbon metilen.

Gugus karbonil amida ditunjukkan oleh pergeseran kimia karbon pada $\delta = 169,2$ ppm sedangkan gugus karbonil ester ditunjukkan pada $\delta = 170,0$ ppm yang lebih *downfield* karena adanya atom oksigen yang lebih elektronegatif dari nitrogen. Signal pada $\delta = 158$; 131,1; 129,2; 126,3 dan 140 ppm menunjukkan pergeseran kimia dari 5 karbon aromatik dari cincin piridin. Pergeseran kimia yang paling *downfield* pada $\delta = 158,0$ ppm adalah karbon kuartener yang berikatan dengan atom nitrogen. Analisis ^{13}C -NMR PSEE juga memberikan signal tajam pada $\delta = 77,20$ ppm. Signal tersebut merupakan pergeseran kimia karbon dari CDCl_3 yang digunakan sebagai pelarut sampel produk PSEE.

Berdasarkan analisis KLT dan data-data spektroskopi di atas membuktikan bahwa senyawa PSEE hasil sintesis telah terbentuk. Produk PSEE hasil sintesis tahap 1 ini digunakan untuk sintesis tahap 2 menghasilkan produk senyawa analog UK-3A, PSEHE dan PSEOE.

IV.1.2. Sintesis senyawa PSEHE dan PSEOE

Sintesis senyawa PSEHE dan PSEOE menggunakan pereaksi hasil sintesis tahap pertama, β -hidroksipikolinil serin etil ester (PSEE) yang direaksikan dengan asam heptanoat dan asam oktanoat. Senyawa UK-3A menunjukkan bahwa gugus aktif yang berperan dalam aktivitas biologi selain gugus hidroksil pada cincin piridin adalah cincin dilakton sembilan (Hanafi, 1995). Perpanjangan rantai ester alifatik, rantai terbuka pada penelitian ini dilakukan sebagai pengganti cincin dilakton yang dimaksudkan untuk mendapatkan senyawa yang diharapkan dapat aktif dengan cara meningkatkan lipofilitasnya. Mekanisme reaksi pembentukan senyawa PSEHE dan PSEOE digambarkan sebagai berikut :



Gambar 15. Mekanisme reaksi pembentukan PSEHE dan PSEOE (Widodo, 1998; Carey & Sunberg, 1991)

Gugus heptanoil dan oktanoil yang ditambahkan merupakan gugus ester alifatik rantai panjang dan bersifat nonpolar yang bertujuan untuk meningkatkan lipofilitas senyawa sehingga diharapkan dapat aktif dalam menghambat pertumbuhan sel kanker. Analisis pendahuluan menggunakan KLT senyawa PSEHE dan PSEOE dengan eluen n-heksana : etil asetat (2:1) menggunakan penampak spot lampu UV = 254 nm dan 365 nm diperoleh spot baru dominan yang naik cukup tajam dibandingkan spot PSEE ($R_f = 0,43$). Analisis KLT pada sampel PSEHE hasil sintesis memperlihatkan spot dominan pada $R_f = 0,58$ (Lampiran 3b) dan pada analisis KLT PSEOE memperlihatkan spot dominan pada $R_f = 0,85$ (Lampiran 3c). Kenaikan spot ini disebabkan menurunnya kepolaran akibat bertambahnya rantai ester. PSEOE mempunyai R_f yang lebih tinggi dari PSEHE disebabkan PSEOE mempunyai gugus oktanoil yang lebih bersifat nonpolar dibandingkan gugus heptanoil pada PSEHE. Spot-spot lain yang tidak dominan merupakan pengotor maupun sisa pereaksi yang tidak diinginkan dalam produk sehingga dilakukan pemurnian dengan ekstraksi pelarut dan kromatografi kolom silika gel.

Sisa asam dalam produk dinetralkan dengan larutan NaOH 1% dan diekstraksi dengan diklorometana dan air untuk memisahkan dari produk dan mengubah sisa DCC menjadi DCU. Hasil pemurnian senyawa menggunakan kromatografi kolom silika gel diperoleh cairan kental jernih kekuningan yang diuji kembali dengan KLT telah menunjukkan satu spot sehingga produk dianggap telah murni. Rendemen PSEHE diperoleh

sebesar 96,85 % (b/b) dan PSEOE sebesar 90,26 % (b/b) berdasarkan perhitungan perbandingan massa produk sintesis setelah pemurnian dengan massa produk secara teori (Lampiran 2.b ; 2.c).

Senyawa PSEHE dan PSEOE yang diperoleh diidentifikasi lebih lanjut dengan analisis spektroskopi sebagai berikut :

IV.1.2.1. Analisis LC-MS

Hasil analisis LC-MS senyawa PSEHE menunjukkan adanya satu signal dominan yang muncul pada kromatogram (Lampiran 4b). Signal dominan dengan waktu retensi 5,0 menit (T5,0) dan luas area 1499486,68 merupakan produk PSEHE. Hal ini dibuktikan oleh spektrum massanya yang menunjukkan berat molekul (M^+) 367 g/mol. Signal pada waktu retensi 8,7 menit (T 8,7) serta signal pada waktu retensi 11,7 menit (T 11,7) merupakan pengotor yang lolos dalam pemurnian. Kemurnian PSEHE dihitung dengan membandingkan luas area P dengan luas total area pada kromatogram sehingga diperoleh kemurnian PSEHE sebesar 94,48 %.

Hasil analisis LC-MS senyawa PSEOE terlihat pula adanya dua signal yang dominan pada kromatogram yang muncul (Lampiran 4c). Signal dominan dengan waktu retensi 4,0 menit (T4,0) dan luas area 1192110,29 yang merupakan signal produk PSEOE yang dibuktikan oleh spektrum massanya berat molekul (M^+) 380 g/mol, sedangkan signal pada waktu retensi 3,2 menit (T3,2) dengan luas area 165986,54 dan signal dengan

waktu retensi 7,7 (T7,7) dengan luas area 24152,13 merupakan pengotor yang lolos dalam pemurnian. Kemurnian PSEOE diperoleh sebesar 86,24%.

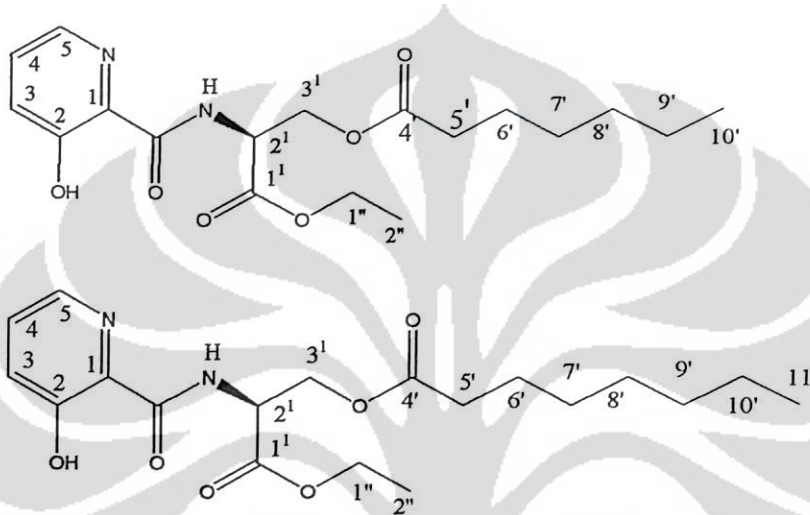
IV.1.2.2. Analisis FT-IR

Hasil analisis FT-IR senyawa PSEHE (Lampiran 5b) menunjukkan pita serapan pada $\bar{\nu} = 3373 \text{ cm}^{-1}$ yang merupakan vibrasi ulur gugus amida sekunder CONH. Vibrasi ulur karbonil ester dan amida ditunjukkan oleh pita serapan pada $\bar{\nu} = 1743 \text{ cm}^{-1}$ dan tekukan NH pada $\bar{\nu} = 1653 \text{ cm}^{-1}$ sedangkan uluran C-O pada $\bar{\nu} = 1292 \text{ cm}^{-1}$. Terbentuknya heptanoil (alifatik) pada $\bar{\nu} = 2858\text{-}2929 \text{ cm}^{-1}$. Uluran hidoksil pada 3394 cm^{-1} yang cukup jelas terlihat pada spektrum FT-IR PESE tidak terlihat pada spektrum FT-IR PSEHE karena telah teresterifikasi oleh asam heptanoat.

Hasil analisis FT-IR senyawa PSEOE (Lampiran 5c) juga menunjukkan vibrasi ulur gugus amida sekunder -CONH oleh pita serapan pada $\bar{\nu} = 3373 \text{ cm}^{-1}$. Vibrasi ulur gugus karbonil ester dan amida ditunjukkan oleh pita serapan pada $\bar{\nu} = 1745 \text{ cm}^{-1}$ dan tekukan NH pada $\bar{\nu} = 1651 \text{ cm}^{-1}$. Uluran C-O terlihat pada $\bar{\nu} = 1296 \text{ cm}^{-1}$. Terbentuknya gugus oktanoil (-CH alifatik) ditunjukkan oleh pita serapan pada $\bar{\nu} = 2854\text{-}2929 \text{ cm}^{-1}$. Spektrum FT-IR PSEE gugus hidoksil pada 3394 cm^{-1} yang cukup jelas terlihat juga hilang karena telah teresterifikasi oleh asam oktanoat.

IV.1.2.3. Analisis $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$

Hasil pengukuran senyawa menggunakan spektrometer $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ dapat dilihat pada Tabel 3 dengan panduan Gambar 16 di bawah ini :



Gambar 16. Struktur molekul senyawa PSEHE dan PSEOE

Tabel 3. Data pergeseran kimia (δ , ppm) dari spektrum $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa PSEHE dan PSEOE.

C/H	Senyawa PSEHE		Senyawa PSEOE	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1''	4,28 (q,2H), 7,3 Hz	51,6	4,21 (q,2H), 7,3 Hz	62,3
2''	1,29 (t,3H), 6,8 Hz	14,3	2,27 (t,3H), 7,4 Hz	14,2
1'	-	173,6	-	173,4
2'	4,59 (dt,1H), 4,3 Hz	63,7	4,92 (dt,1H), 4,3 Hz	63,5
3'	4,49 (dd, 1H), 3,7 Hz 4,48 (dd,1H), 4,3 Hz	62,4	4,51 (dd,1H), 3,7 Hz 4,42 (dd,1H), 4,3 Hz	62,5
4'	-	169,0	-	168,7

Tabel.3.Lanjutan

5'	2,32 (t, 1H), 2,3 Hz	34,2	2,25 (t,1H), 7,4 Hz	51,8
6'	1,32 (m,2H)	31,2	1,72 (m,2H)	34,0
7'	1,29 (m,2H)	31,0	1,25 (m,2H)	31,6
8'	1,27 (m,2H)	29,2	1,23 (m,2H)	29,0
9'	1,25 (m,2H)	29,1	1,22 (m,2H)	28,9
10'	0,84 (t,3H), 14 Hz	14,3	1,18 (m,2H)	30,9
11'	-	-	0,79 (t,3H), 7,4 Hz	14,1
1	-	158	-	157,9
2	-	131,0	-	131,0
3	7,37 (dd,1H), 8,6 Hz	129,0	7,29 (dd,1H), 4,3 Hz	129,1
4	7,31 (dd,1H), 8,5 Hz	126,1	7,24 (dd,1H),18,3 Hz	126,1
5	8,10 (dd,1H), 4,3 Hz	140,0	8,04 (dd,1H), 3,1 Hz	140,0
OH-Ph	11,7 (s,1H)	-	11,65 (s,1H)	-
CONH	8,66 (d,1H), 7,9 Hz	168,9	8,61 (d,1H), 8,6 Hz	168,9

Data pergeseran kimia $^1\text{H-NMR}$ senyawa PSEHE (Lampiran 7.a) di atas dapat dijelaskan sebagai berikut :

1. Gugus heptanoil yang terbentuk terlihat dengan adanya signal pada $\delta = 0,84$ ppm (t,3H) yang menunjukkan pergeseran kimia proton proton C 10', Signal-signal metilen C 6'- C 9' yang ekuivalen terlihat pada $\delta = 1,32$ ppm (m.2H) sampai pada $\delta = 1,60$ (m, 2H).
2. Terbentuknya gugus ester baru juga ditunjukkan oleh gugus metilen C3' pada $\delta = 4,49$ ppm (dd, 1H) dan $\delta = 4,48$ ppm (dd, 1H) yang muncul dua

signal (*coupling*) oleh kedua proton dan doublet-doublet karena berinteraksi dengan metin pada posisi α dan nitrogen amida pada posisi β , sedangkan gugus hidroksil telah tersterifikasi, sehingga C3' juga muncul lebih *downfield* dari PSEE. Gugus metin C2' ditunjukkan pada $\delta = 4,59$ ppm (dt, 1H) yang berinteraksi dengan NH amida dan metilen, muncul *downfield* karena berdekatan dengan karbonil ester dan amida pada posisi α . Pergeseran kimia pada $\delta = 4,28$ ppm (q, 2H) menunjukkan gugus metilen C1'' yang *downfield* karena berdekatan dengan atom oksigen gugus ester.

3. Adanya gugus amida ditunjukkan oleh signal yang muncul pada $\delta=8,66$ ppm (d, 1H) yang berasal dari 1 proton gugus amida yang berinteraksi dengan gugus metin dan muncul *downfield* karena membentuk ikatan hidrogen intermolekuler. Cincin piridin menunjukkan signal-signal yang lebih *downfield* dari alkil karena mengandung atom nitrogen dan berdekatan dengan gugus hidroksil dan amida. Signal-signal karbon piridin terlihat pada $\delta = 7,37$ (dd, 1H, C3-Ph), 7,31 (dd, 1H, C4-Ph) dan 8,10 ppm (dd, 1H, C5-Ph) berupa *splitting* proton yang muncul doublet-doublet. Signal dengan pergeseran kimia lainnya pada $\delta = 11,71$ ppm (s, 1H, OH-Ph) muncul singlet akibat 1 buah proton dari gugus hidroksil yang terikat pada atom C-2 cincin piridin dan muncul *downfield* karena membentuk ikatan hidrogen intramolekuler dengan gugus karbonil amida.

Data spektrum ^{13}C -NMR yang mendukung terbentuknya senyawa PSEHE (Lampiran 7.b) ditunjukkan oleh adanya signal-signal pergeseran kimia sebagai berikut :

1. Gugus heptanoil yang terbentuk ditunjukkan oleh signal-signal karbon rantai alifatik heptanoil C5'-C10' pada $\delta = 34,2 - 14,3$ ppm. Signal karbonil C4' terlihat pada $\delta = 169,0$ ppm yang *downfield* karena terbentuknya rantai ester.
2. Signal karbonil ester C1' ditunjukkan oleh signal pada $\delta = 173,6$ ppm yang berinteraksi dengan etil C1" pada $\delta = 51,6$ ppm. Signal metin C2' dan metilen C3' muncul pada $\delta = 63,7$ ppm dan $\delta = 62,4$ ppm yang lebih *downfield* dari PSEE karena atom oksigen di dekatnya teresterifikasi.
3. Gugus hidrosipikolinil amida terlihat oleh serapan kimia karbon amida yang muncul pada $\delta = 168,9$ ppm. Cincin piridin ditunjukkan oleh serapan kimia karbon C1-C5. C1 dan C5 muncul pada $\delta = 158,0$ dan $140,0$ ppm yang *downfield* karena berikatan dengan nitrogen dalam cincin, namun C1 muncul lebih *downfield* pada $\delta = 158,0$ ppm karena berikatan dengan oksigen yang lebih elektronegatif. C3 dan C4 muncul kurang *downfield* pada $\delta = 129,0$ dan $126,1$ ppm karena cukup jauh dari gugus elektronegatif. Analisis ^{13}C -NMR PSEHE juga memberikan serapan tajam pada $\delta = 77,20$ ppm yang merupakan pergeseran kimia karbon dari CDCl_3 sebagai pelarut sampel produk PSEHE.

Data pergeseran kimia $^1\text{H-NMR}$ PSEOE (Lampiran 8.a) menunjukkan signal-signal proton yang membuktikan adanya senyawa PSEOE sebagai berikut:

1. Adanya gugus oktanoil terlihat oleh signal pada $\delta = 0,79$ ppm (t, 3H) yang menunjukkan pergeseran kimia proton C11'. Signal-signal metilen C6'-C10' yang ekuivalen terlihat pada $\delta = 1,72 - 1,18$ ppm yang muncul sebagai multiplet.
2. Pergeseran kimia gugus metilen C3' juga menunjukkan terbentuknya gugus ester baru pada $\delta = 4,42$ (dd, 1H) dan ppm $\delta = 4,51$ ppm (dd, 1H) (*coupling*) yang muncul doublet-doublet karena berinteraksi dengan metin pada posisi α dan nitrogen amida pada posisi β , sedangkan gugus hidroksil telah tersterifikasi, sehingga C3' juga muncul lebih *downfield* dari PSEE. Gugus metin ditunjukkan pada $\delta = 4,92$ ppm (dd, 1H) yang berinteraksi dengan NH amida dan metilen, muncul *downfield* karena berdekatan dengan karbonil ester dan amida pada posisi α . Pergeseran kimia pada $\delta = 2,27$ ppm (t, 3H) menunjukkan gugus metil C2'.
3. Gugus amida ditunjukkan oleh signal yang muncul pada $\delta = 8,61$ ppm (d, 1H) yang berinteraksi dengan gugus metin dan muncul *downfield* karena membentuk ikatan hidrogen intermolekuler. Signal-signal karbon piridin terlihat pada $\delta = 7,29$ (dd, 1H, C3-Ph), 7,24 (dd, 1H, C4-Ph) dan 8,04 ppm (dd, 1H, C5-Ph). Signal pada pergeseran kimia $\delta = 11,65$ ppm (s, 1H, OH-Ph) muncul singlet akibat 1 buah proton dari gugus hidroksil yang

terikat pada atom C-2 cincin piridin dan muncul *downfield* karena membentuk ikatan hidrogen intramolekuler dengan gugus karbonil amida.

Data spektrum ^{13}C -NMR yang mendukung terbentuknya senyawa PSEOE (Lampiran 8.b) ditunjukkan oleh adanya pergeseran kimia sebagai berikut :

1. Gugus oktanoil yang terbentuk ditunjukkan oleh signal-signal karbon rantai alifatik oktanoil C6'-C11' pada $\delta = 34,0 - 14,1$ ppm. Signal karbonil C4' terlihat pada $\delta = 168,7$ ppm yang *downfield* karena terbentuknya rantai ester.
2. Adanya signal karbonil ester C1' ditunjukkan oleh signal pada $\delta = 173,4$ ppm yang berinteraksi dengan metilen C1" pada $\delta = 62,3$ ppm. Signal metin C2' dan metilen C3' muncul pada $\delta = 62,5$ ppm dan $\delta = 63,5$ ppm yang lebih *downfield* dari PSEE karena atom oksigen di dekatnya teresterifikasi.
3. Gugus hidroksipikolinil amida terlihat oleh serapan kimia karbon amida yang muncul pada $\delta = 168,9$ ppm. Cincin piridin ditunjukkan oleh serapan kimia karbon C1-C5. C1 dan C5 muncul pada $\delta = 157,9$ dan 140 ppm yang *downfield* karena berikatan dengan nitrogen dalam cincin, C2 muncul cukup *downfield* pada $\delta = 131,0$ ppm karena berikatan dengan oksigen yang lebih elektronegatif. C3 dan C4 muncul kurang *downfield* pada $\delta = 129,0$ dan 126,1 ppm karena cukup jauh dari gugus elektronegatif. Analisis ^{13}C -NMR PSEOE juga memberikan signal tajam

pada $\delta = 77,20$ ppm yang merupakan pergeseran kimia karbon dari CDCl_3 sebagai pelarut sampel produk PSEOE.

Hasil analisis menggunakan KLT, LC-MS, FT-IR, $^1\text{H-NMR}$, dan $^{13}\text{C-NMR}$ di atas membuktikan bahwa senyawa PSEHE dan PSEOE hasil sintesis telah terbentuk dengan kemurnian yang tinggi. Kedua senyawa kemudian diuji aktivitasnya dengan menggunakan uji sitotoksitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach.

IV.2. Uji Toksisitas Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)

Pada penelitian ini uji BSLT dilakukan dengan menggunakan metode Meyer. Uji aktifitas terhadap udang *Artemia salina* Leach dilakukan untuk mengetahui efek toksisitas yang disebabkan oleh senyawa hasil sintesis yaitu PSEHE dan PSEOE. Efek toksisitasnya diukur dengan menentukan nilai LC_{50} . Hasil uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach yang terlihat dalam Tabel berikut :

Tabel.4. Hasil Pengujian Brine Shrimp Lethality Shrimp (BSLT)

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Hidup awal			Mati	Hidup	Akumulasi mati	Akumulasi hidup	Mortalitas	LC_{50}
PSEHE	200	10	10	10	0	30	0	96	0,00	933,25
	400	10	10	10	3	27	3	66	4,35	
	500	10	10	10	6	24	9	39	18,75	
	1000	10	10	10	15	15	24	15	61,54	
PSEOE	200	10	10	10	0	30	0	108	0,00	549,54
	400	10	10	10	4	26	4	45	8,16	
	500	10	10	10	13	17	17	19	47,22	
	1000	10	10	10	28	2	45	2	95,74	

Mortalitas dapat dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\text{Mortalitas} = \left[\frac{\text{Jumlah mati}}{\text{Akumulasi mati} + \text{Akumulasi hidup}} \right] \times 100\%$$

Berdasarkan rumus diatas didapatkan nilai mortalitas seperti terlihat pada Tabel.5.

Harga LC_{50} dihitung berdasarkan pengamatan setelah 24 jam penambahan senyawa uji dengan membuat grafik regresi linier dari tabel.4, yaitu antara % mortalitas dengan konsentrasi untuk masing masing senyawa yang diujikan, kemudian mengalurkan pada grafik garis tersebut sehingga diperoleh konsentrasi senyawa uji yang menyebabkan 50 % kematian.

Dari data tabel.4. diatas menunjukkan baik untuk senyawa PSEHE maupun PSEOE bahwa peningkatan konsentrasi akan menyebabkan peningkatan prosentase mortalitas. Harga LC_{50} kedua senyawa yaitu PSEHE = 933,25 ppm dan PSEOE 549,54 ppm merupakan nilai yang kurang dari harga $LC_{50} = 1000$ ppm, yang menandakan kedua senyawa ini baik PSEHE maupun PSEOE merupakan senyawa yang aktif atau mempunyai efek toksisitas.

Dari Tabel.4. menunjukkan bahwa nilai LC_{50} PSEHE > LC_{50} PSEOE yang berarti efek toksisitas senyawa PSEOE lebih besar dibandingkan dengan senyawa PSEHE. Dari hasil pengamatan ini dapat disimpulkan bahwa dengan bertambah panjangnya rantai samping alifatik pada gugus ester maka efek toksisitas semakin meningkat. Hal ini diakibatkan bertambahnya sifat kenonpolaran senyawa sehingga lipofilitas bertambah dan akan meningkatkan kemampuan senyawa dalam menembus dinding sel.

IV.3. Uji Sitotoksitas terhadap Sel Kanker *Murine leukemia P-388*

Uji aktivitas senyawa analog UK-3A, yaitu senyawa PSEHE dan PSEOE sebagai antikanker dilakukan secara *in vitro* terhadap sel kanker *Murine leukemia P-388*. Uji aktivitas sitotoksik ini dilakukan dengan metode MTT (3-(4,5-dimetiltiazo-2-il-)2,5-difeniltetrazolium bromida). Metode ini diawali dengan melakukan inokulasi sel dengan jumlah 3×10^3 sel/mL dalam media RPMI 1640 yang dilengkapi *fetal bovine serum* (FBS) dan larutan kanamisin sebagai antibiotik, pada 96 lubang *microplate*. Setelah inokulasi dilakukan penambahan sampel PSEHE dan PSEOE masing-masing dengan ragam konsentrasi 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; dan 100 $\mu\text{g/mL}$. Sebagai kontrol positif menggunakan senyawa antikanker cis-platina dengan ragam konsentrasi yang sama. Setelah 48 jam dari penambahan sampel dilakukan penambahan reagen MTT dan sel diinokulasi kembali. Setelah 4 jam dilakukan penambahan *stop solution* untuk menghentikan reaksi MTT. Perhitungan respon viabilitas sel dilakukan berdasarkan pengukuran *optical density* menggunakan *microplate reader* pada $\lambda = 550$ nm dan 700 nm. Sel hidup berbentuk bulat dan berwarna biru karena merubah pereaksi warna dan sel mati berbentuk tidak teratur dan berwarna kuning karena tidak merubah pereaksi warna. Besarnya intensitas larutan sebanding dengan jumlah sel hidup. Hasil pengukuran diperoleh nilai absorbansi (A) rata-rata untuk tiap lubang dari tiga kali ulangan. Nilai A kemudian dimasukkan dalam grafik untuk memperoleh nilai IC_{50} .

Efek penghambatan senyawa hasil sintesis terhadap pertumbuhan sel kanker *Murine leukemia* P-388 dilihat berdasarkan perbandingan jumlah sel yang mati dan sel yang tetap hidup setelah perlakuan dengan senyawa. Besarnya penghambatan dinyatakan dalam nilai IC_{50} yang menunjukkan hambatan pertumbuhan sel kanker sebesar 50%. Hasil uji sitotoksitas senyawa hasil sintesis terhadap sel kanker *Murine leukemia* P 388 dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 5. Hasil uji sitotoksitas senyawa analog UK-3A; PSEHE dan PSEOE terhadap sel kanker *Murine leukemia* P-388.

Senyawa	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
PSEHE	38,0
PSEOE	53,0
Cis-platina	12,0
UK-3A (Ueki, et all 1997)	38,0

Senyawa *cis-platina* sebagai kontrol positif memperlihatkan aktivitas yang cukup tinggi dalam menghambat pertumbuhan sel kanker *Murine leukemia* P-388 jika dibandingkan dengan senyawa analog UK-3A, yaitu dengan nilai IC_{50} sebesar 12 $\mu\text{g/mL}$. Senyawa analog UK-3A hasil sintesis, yaitu PSEHE dan PSEOE menunjukkan aktivitas yang rendah dalam menghambat pertumbuhan sel kanker *Murine leukemia* P-388. Senyawa PSEHE memiliki IC_{50} yang sama dengan nilai IC_{50} senyawa induk UK-3A. Senyawa PSEOE memiliki nilai IC_{50} yang lebih besar, sehingga aktivitasnya

lebih rendah dibanding PSEHE dan senyawa induk UK-3A. Pembukaan cincin dilakton beranggota sembilan pada senyawa UK-3A menjadi diester pada PSEHE dan PSEOE cenderung menurunkan aktivitas senyawa. Penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa pembukaan cincin dilakton beranggota sembilan pada UK-2A meningkatkan aktivitas senyawa (Usuki 2006) tidak berlaku pada senyawa UK-3A.

Aktivitas senyawa hasil sintesis juga semakin menurun dengan penambahan panjang rantai pada gugus ester. Hal ini tidak sesuai dengan penelitian sebelumnya menyatakan bahwa bertambahnya sifat hidrofobik senyawa akan meningkatkan aktivitasnya (Hanafi *et al.* 1999) karena berkaitan dengan kemampuan senyawa dalam menembus dinding sel. Penelitian lain menyebutkan aktivitas senyawa akan semakin tinggi jika kepolarannya mendekati kepolaran dinding sel. Apabila suatu senyawa terlalu hidrofob justru aktivitasnya akan menurun (Berger 2001).

IV.4. Stereokimia Senyawa β -Hidroksipikolinil serin etil heptanoil ester (PSEHE) dan β -Hidroksipikolinil serin etil oktanoil ester (PSEOE).

Berbagai struktur senyawa tidak simetris dapat memutar bidang polarisasi radiasi. Senyawa tersebut dikenal sebagai zat optis aktif. Pemutaran dapat berupa dextrorotary (+) bila arahnya sesuai dengan arah putar jarum jam ataupun laevorotary (-) bila arahnya berlawanan dengan arah putaran jam.

Baik senyawa PSEHE dan PSEOE memiliki satu atom C kiral atau atom C asimetris, yaitu pada posisi atom C 2' (Gambar.16), berarti kedua senyawa ini dapat memutar bidang polarisasi.

Berdasarkan pengukuran dan perhitungan dengan menggunakan polarimeter didapatkan nilai rotasi spesifik larutan $[\alpha]_D^{25}$ untuk senyawa PSEHE dan PSEOE adalah $+25^\circ$ dan $+50^\circ$ (lampiran 10.a dan 10.b)

Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa baik reaksi tahap pertama yaitu reaksi amidasi dan reaksi tahap kedua yaitu reaksi esterifikasi tidak merubah stereotifitas.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

V.1. Kesimpulan

1. Senyawa analog UK-3A ; β -hidroksipikolinil serin etil heptanoil ester PSEHE dan β -hidroksipikolinil serin etil oktanoil ester (PSEOE) dapat disintesis melalui dua tahap reaksi, tahap pertama yaitu; reaksi amidasi yang menghasilkan senyawa β -hidroksipikolinil serin etil ester (PSEE) dan tahap kedua yaitu; reaksi esterifikasi yang menghasilkan senyawa PSEHE dan PSEOE.
2. Kemurnian senyawa β -hidroksipikolinil serin etil ester (PSEE) yang diperoleh sebesar 85,22 % dan senyawa β -hidroksipikolinil serin etil heptanoil ester (PSEHE) diperoleh sebesar 94,48 % .serta senyawa β -hidroksipikolinil serin etil oktanoil ester (PSEOE) diperoleh sebesar 86,24 %.
3. Uji Toksisitas senyawa β -hidroksipikolinil serin etil heptanoil ester (PSEHE) dan senyawa β -hidroksipikolinil serin etil oktanoil ester (PSEOE) terhadap larva udang *Artemia salina* Leach diperoleh nilai LC₅₀ masing masing untuk PSEHE sebesar 933,25 ppm dan PSEOE sebesar 549,54 ppm.
4. Uji sitotoksisitas senyawa β -hidroksipikolinil serin etil heptanoil ester (PSEHE) dan senyawa β -hidroksipikolinil serin etil oktanoil ester (PSEOE) terhadap sel kanker *Murine leukemia* P 388 diperoleh nilai IC₅₀ masing masing untuk PSEHE sebesar 38,0 $\mu\text{g/mL}$ dan PSEOE sebesar 53,0 $\mu\text{g/mL}$.

V.2. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian sintesis senyawa analog UK-3A dengan struktur yang berbeda, yaitu dengan meragamkan gugus fungsi.
2. Perlu dilakukan uji aktivitas lainnya terhadap senyawa hasil sintesis ini baik untuk senyawa PSEHE maupun PSEOE.



DAFTAR PUSTAKA

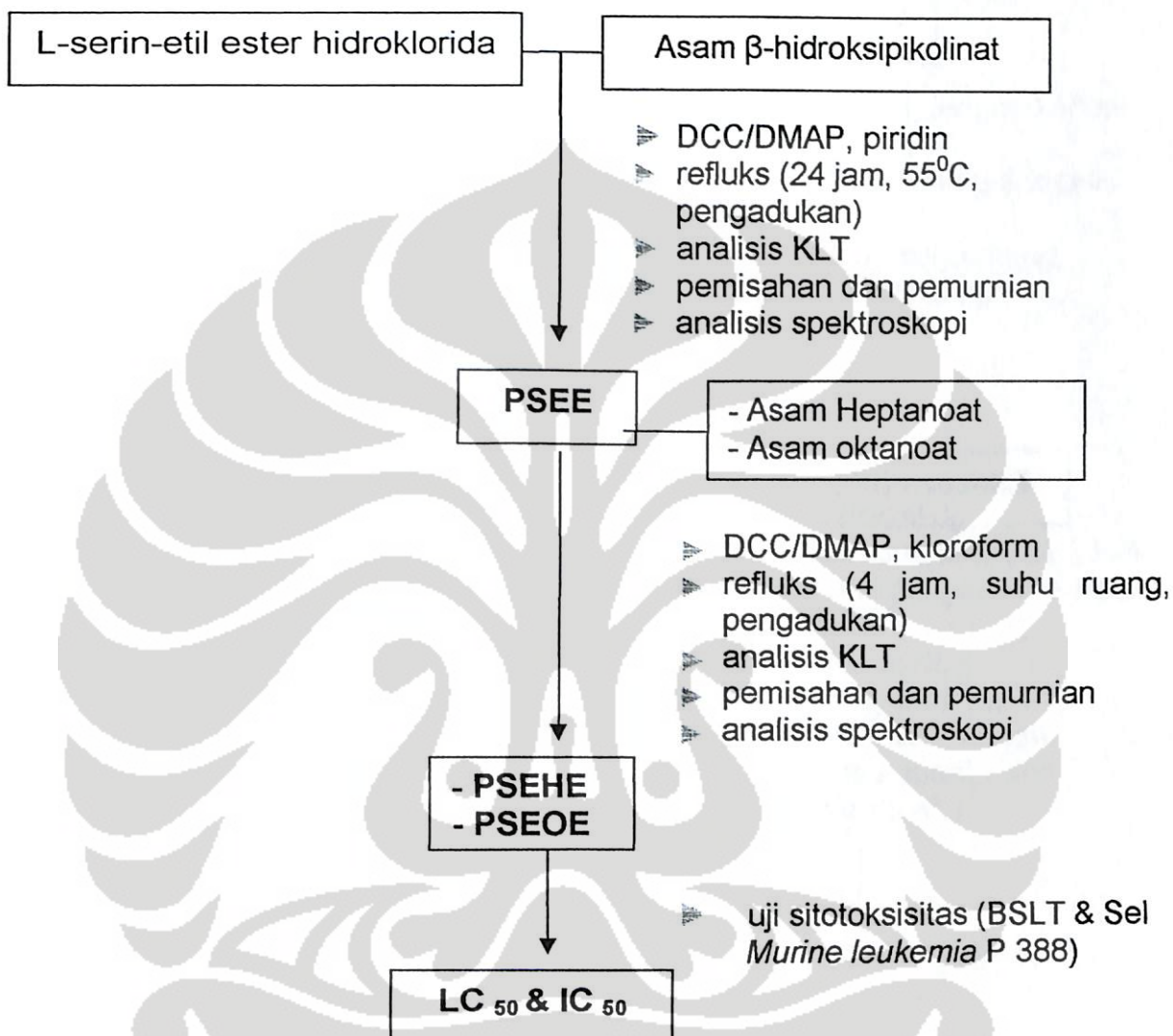
- Anonim. 2006. *Apa Yang Harus Anda Ketahui Tentang Kanker*. Yayasan Kanker Indonesia
http://news.indosiar.com/news_read.htm?id=21479 Diakses tanggal 7 April 2006.
- _____. 2006. *Kanker : Leukemia*. <http://id.wikipedia.org/wiki/kanker>.
Diakses tanggal 14 Juni 2006.
- Arsianti, A. 1998. *Sintesis dan Uji Aktivitas Biologi Senyawa Analog Antibiotika UK-3 (2-Hidroksinikotinil-Heksil-Serin-Ester dan Turunannya*. Tesis Magister Sains Ilmu Kimia Program Pascasarjana UI. Depok.
- Budi, G. S. 2006. *Identifikasi Senyawa Bioaktif Ekstrak Kulit Batang Tanjung (Bruguiera gymnorhiza) dalam Etanol dan Uji Sitotoksitasnya terhadap Sel HeLa*. Skripsi PS. MIPA UNSOED. Purwokerto (Carey, F. A. and R. J. Sunberg. 1991. *Advanced Organic Chemistry, 3rd ed. part 3 : Reaction and Syntheses*. Plenum Press. New York.
- Chasani, M. 2002. *Sintesis Senyawa Turunan Kalanon dan Uji Aktivitas Biologinya*. Tesis. Program Pascasarjana Universitas Indonesia. Depok .
- Danial, M. P. P. 2005. *Toksisitas Minyak Atsiri dari Ekstrak n-Heksana Biji dan Daging Buah Phaleria macrocarpa (Scheff) Boerl Terhadap Sel Mononuklir Perifer Normal Manusia*. Skripsi FMIPA UGM. Yogyakarta.
- Dey, P. M. J. B. Harborne. 1991. *Methods in Plant Biochemistry, Volume 6 Assay for Bioactivity*. Academic Press. London.
- Fessenden, R. J. J. S. Fessenden. 1986. *Kimia Organik, Jilid 1 dan 2*. Penerjemah: A. Hadyana Pudjaatmaka. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Foye, W. O. 1995. *Kimia Medisinal*. UGM Press. Yogyakarta.
- Hakim, E. H. 2003. *Bergenin, Suatu Dihidrosukomarin dari Kayu dan Kulit Batang Shorea stenoptera Burek*. Prosiding ITB Vol. 35A, No.2. <http://tl.lib.itb.ac.id/go.php?id=jbptitbpp-gdl-proc-2003-euisholiso-1724>. Diakses tanggal 6 Januari 2007.

- Hanafi, M. 1995. *Studies of Novel Antibiotics Metabolites from Streptomyces sp. 517-02*. Thesis Departemen of Chemistry Faculty of Science. Osaka City University. Osaka.
- _____. 1997. *Studi Korelasi Struktur Molekul dan Aktivitas Biologi dari Antibiotika UK-2A, UK-3A, Turunan dan Analognya*. Prosiding Konferensi Nasional I, Kimia dalam Pembangunan. Yogyakarta.
- Hanafi, M., M. Ueki, A. Kusumoto, K. Shibata, T. Tanaka, M. Taniguchi. 1997. *UK-3A, a Novel Antifungal from Streptomyces sp. 517-02 : Fermentation, Isolation, Structural Elucidation, and Biological Properties*. The Journal of Antibiotics, Vol 50. No 7 pp 551-555. Faculty of Science. Osaka City University. Osaka.
- Hanafi, M, A.B. Thelma. 1998. *Sintesis Senyawa Analog Antibiotika UK-3, Pengaruh Gugus Hidroksi terhadap Aktivitas Biologi*. Prosiding Seminar Nasional II Kimia dalam Pembangunan Holiday Inn. Yogyakarta.
- Hart, H. 2003. *Kimia Organik Suatu Kuliah Singkat*, edisi kesebelas. Erlangga. Jakarta.
- Heriady, Y. 2005. *Memilih Obat Anti Kanker yang Tepat*. Artikel Berita. <http://www.pontianakpost.com/berita/index>. Diakses tanggal 7 April 2006.
- Juliawati, L. D. 2005. *Tiga Senyawa Oligostibelbenoid dari Kulit Batang Dipterocarpus Retusus Blume (Dipterocarpaceae)*. Jurnal Matematika dan Sains, Vol. 10(4).
- Katzung, B. G. 1998. *Farmakologi Dasar dan Klinik, Edisi VI*. Penterjemah : Staf Dosen Farmakologi FK Universitas Sriwijaya. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Khopkar, S. M. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. UI-Press. Jakarta.
- Lu, F. C. 1995. *Toksikolog Dasar Asas, Organ Sasaran, dan Penilaian Risiko*. Penterjemah : Edi Nugroho. UI-Press. Jakarta.
- Mulyadi, S. 1995. *Isolasi dan Elusidasi Struktur Kandungan Daun Epatorium Inulifolium yang Bersifat Sitotoksik*. UGM. Yogyakarta.
- Pine, S. H., J.B.Hendrickson, D.J. Crom,. 1998. *Kimia Organik 2*. Penterjemah : Roehyati J. Dan Susanti W. B. Penerbit ITB. Bandung.

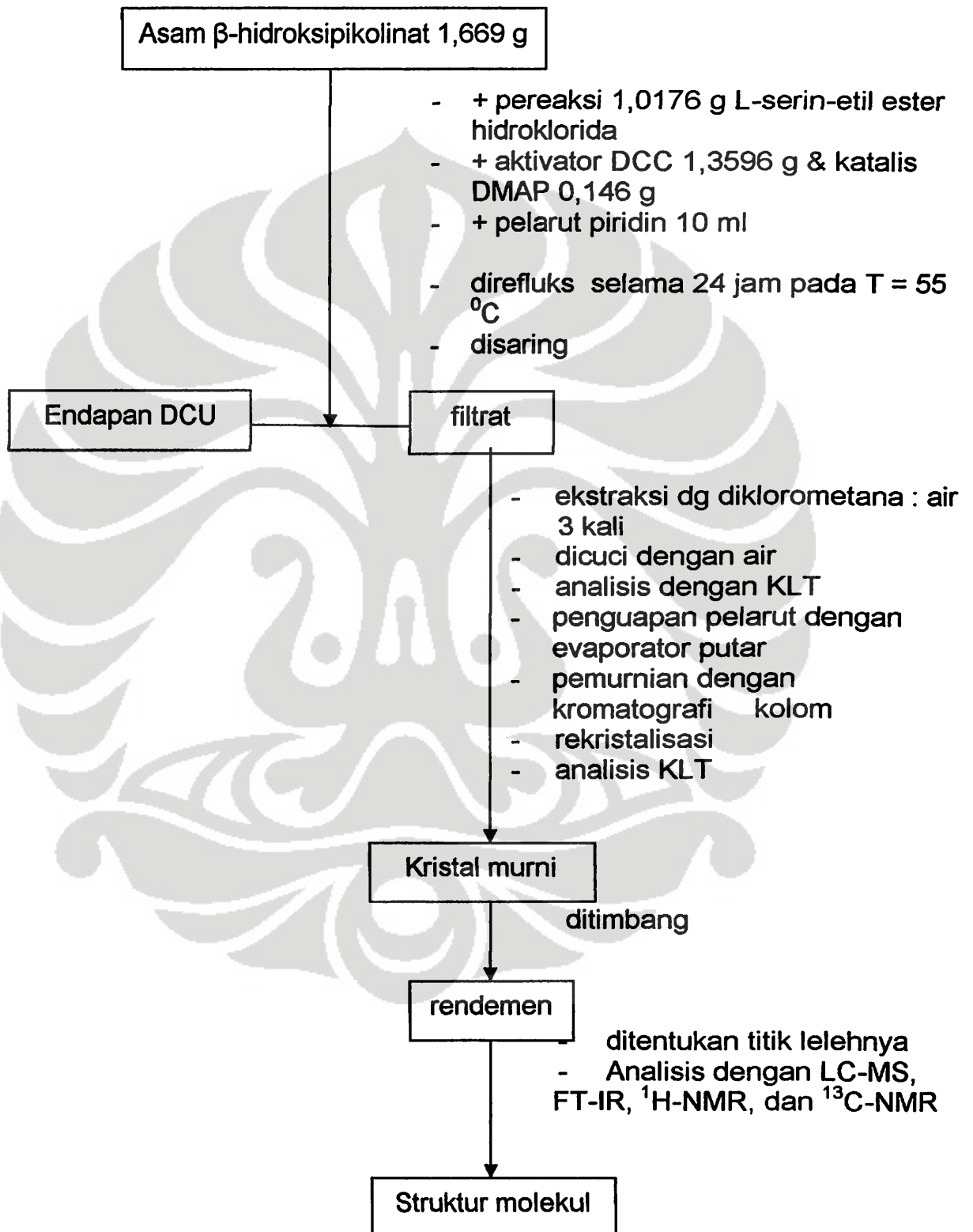
- Primadona, I. , Z.U. Linar., A. Rina. 2006. *Prospek Tumbuhan Indonesia sebagai Antikanker*. Jurnal Penelitian. Pusat Penelitian Kimia LIPI. Bandung.
- Rahmawati, N. 2004. *Uji Sitotoksisitas Ekstrak Etanolik Daun Bandotan (Ageratum conizoides L) terhadap Sel HeLa dan Profil Kromatografi Lapis Tipisnya*. Skripsi Fakultas Farmasi UGM. Yogyakarta.
- Rosalina, L. 1999. *Sintesis dan Uji Aktivitas Biologi Senyawa Analog Antibiotika UK-3 3-Hidroksipikolinil Dialkil Glutamat Ester dan 2-Hidroksinikotinil Dialkil Glutamat Ester*. Tesis Magister Sains Ilmu Kimia Program Pascasarjana UI. Depok.
- Sahidin, H.H,Euis ., D.J, Lia ., M.S. Yana , Emilia L. G., L. Jalifah ., M.Ikram, A.A. Syamsul . 2005. *Cytotoxic Properties of Oligostilbenoids from the Treebarks of Hopea dryobalanoides*. <http://www.naturforsch.com>. Diakses Tanggal 1 Juni 2006.
- Sherley. 1998. *Sintesis dan Uji Aktivitas Biologi Senyawa Analog Antibiotika UK-3 (2-hiroksinikotinil-Heksil-Serin-Ester dan Turunannya*. Tesis Magister Sains Ilmu Kimia Program Pascasarjana UI. Depok.
- Siswandono B. Soekardjo. 2000. *Kimia Medisinal Jilid 1 dan 2*. Airlangga University Press. Surabaya.
- _____. 1998. *Prinsip-Prinsip Rancangan Obat*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Siswono. 2004. *Leukimia Peringkat Pertama Penyakit pada Anak*. Sumber : Media Indonesia. <http://www.gizi.net/cgi-bin/berita/fullnews>. Diakses tanggal 14 Juni 2006.
- Ueki, M. 1995. *Studies on Novel Bioactive Metabolites from Streptomyces Sp. 517-02*. Thesis Departemnt of Chemistry Faculty of Science Osaka City University. Osaka.
- Underwood, J. C. E. 1999. *Patologi Umum dan Sistemik*. Penerjemah Prof. Dr. Sarjadi, dr., SpPA. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.

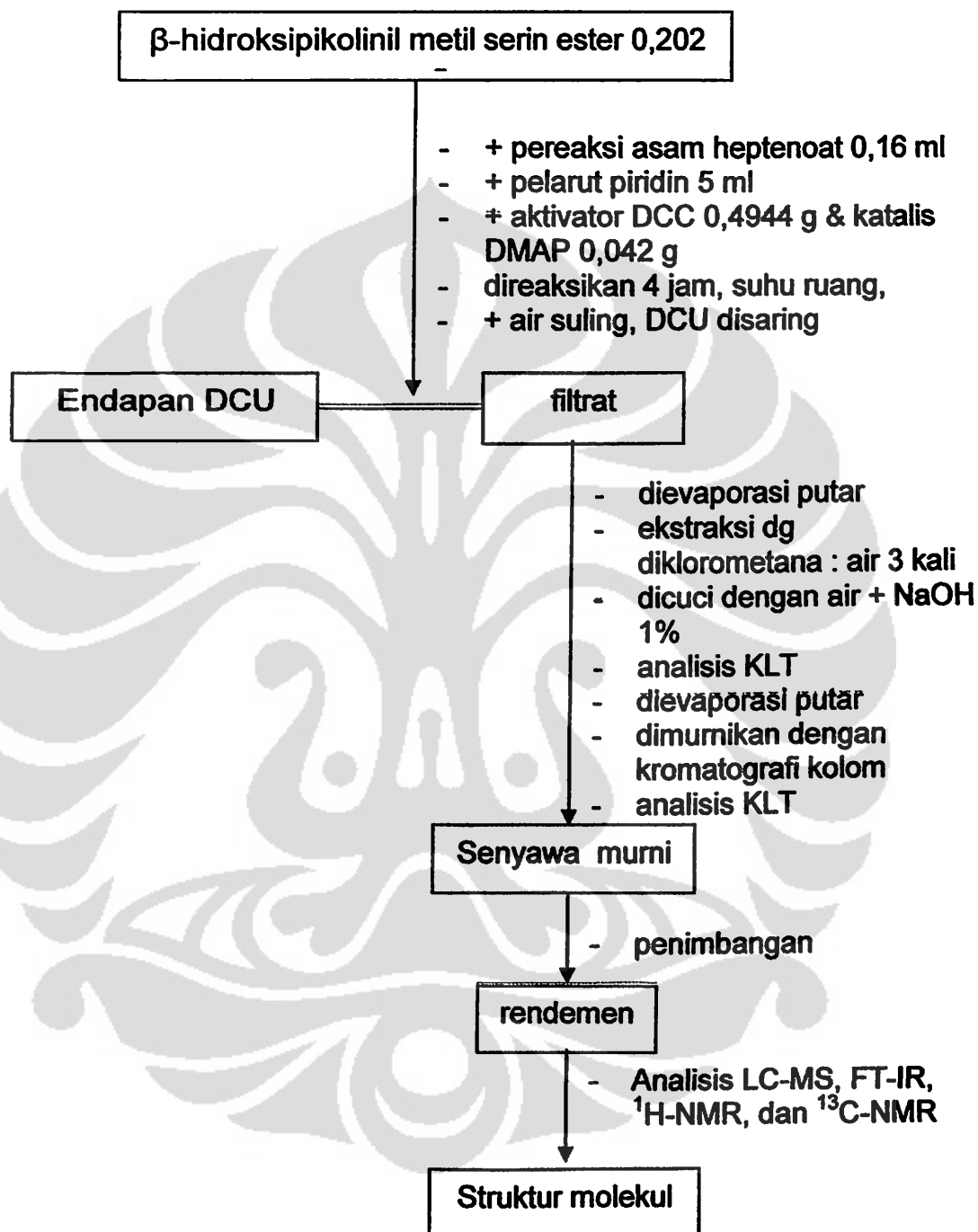
LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema kerja penelitian

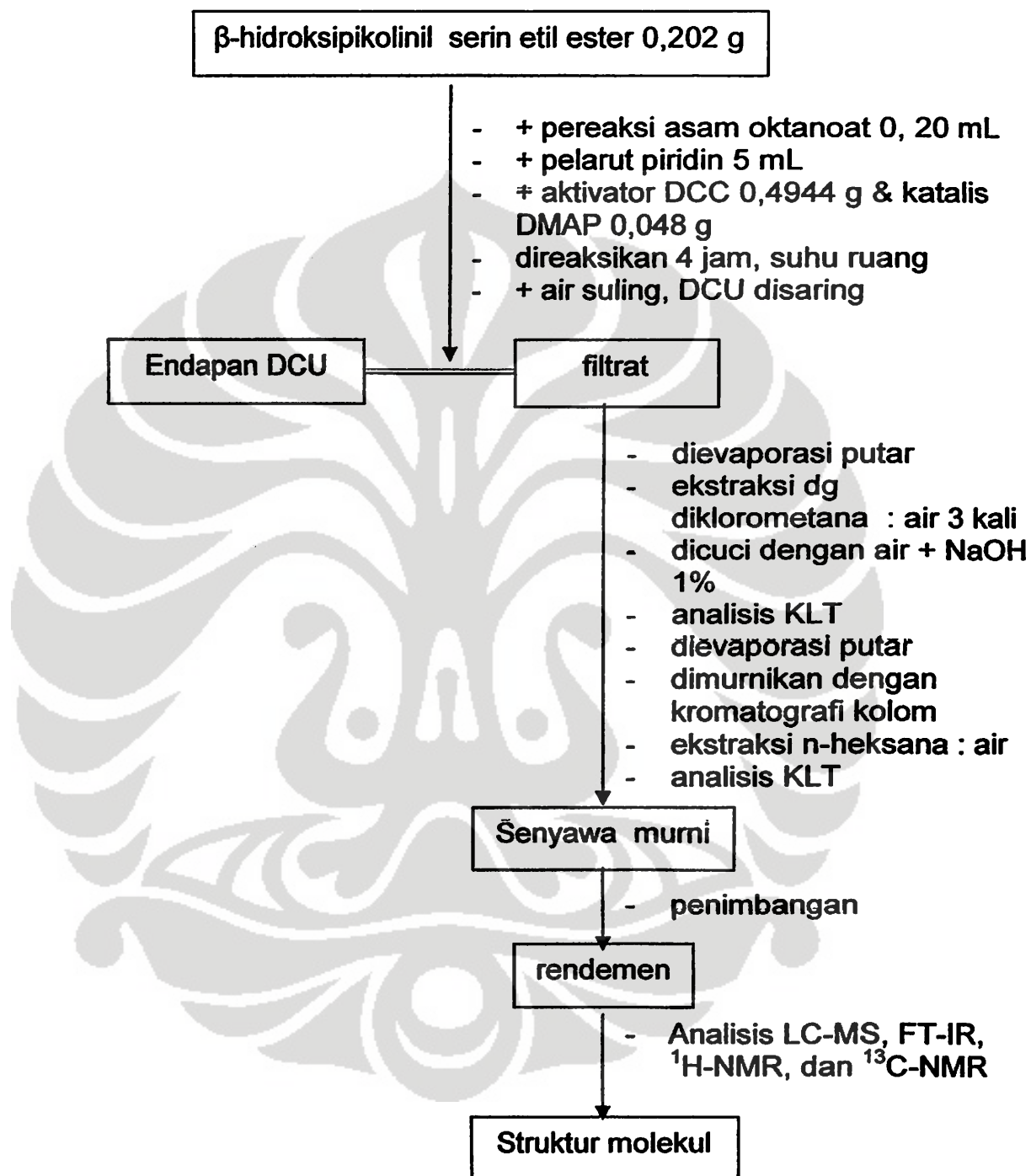


a. Sintesis senyawa β -hidroksipikolinil etil serin ester (PSEE)



b. Sintesis senyawa β -hidroksipikolinil serin etil heptanoil ester (PSEHE)

c. Sintesis senyawa β -hidroksipikolinil serin etil oktanoil ester (PSEOE)



d. Uji Sitotoksitas Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)

Penetasan telur *Artemia salina* Leach



Pembuatan larutan uji



Pengujian



Analisis data



LC₅₀

- Dalam wadah, tertutup dengan aluminium foil, bagian terbuka disinari lampu TL 20, dibiarkan selama 48 jam.

- 4 mg sampel dilarutkan dalam ke dalam 2,0 mL air laut yang sudah disaring (2000 ppm)
- Diencerkan sampai diperoleh konsentrasi 1000, 800, 400 ppm, jika sampel sukar larut dibantu dengan dimetil sulfoksida (DMSO) 1% sebanyak 10 µL.

- Dipipet 100 µL air laut yang berisi 10-12 larva udang *Artemia salina* Leach, ditambahkan 100 µL larutan sampel untuk masing masing konsentrasi akhir untuk tiap tiap wadah adalah 1000 ppm, 500 ppm, 400 ppm dan 200 ppm.

- Dilakukan 3 kali pengulangan (triplo), sebagai larutan kontrol dibuat tanpa larutan sampel.

- Pengamatan dilakukan setelah 24 jam dengan melihat jumlah larva udang yang mati.

- Dihitung tingkat mortalitas (%) dengan membandingkan jumlah larva yang mati dengan total jumlah larva.

e. Uji Sitotoksitas

Sel *Murine Leukemia P-388*

- ditumbuhkan dalam media RPMI 1640 + FBS, streptomisin dan antibiotik
- diinkubasi 24 jam
- + sampel yang telah diberi DMSO dan PBS
- diinkubasi 48 jam
- + MTT dan diinkubasi lagi 4 jam
- + SDS dan diinkubasi lagi 24 jam
- dilihat jumlah sel yang mati dengan *microplate* 550 nm
- dibuat grafik jumlah sel yang mati (%) dengan konsentrasi (μM)

IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)

Lampiran 2. Perhitungan rendemen

a. Perhitungan rendemen β -hidroksipikolinil serin etil ester (PSEE)

Persamaan reaksi :



Mula-mula :	6 mmol	12 mmol	
Reaksi :	6 mmol	6 mmol	6 mmol
<hr/>			
Sisa :	-	6 mmol	6 mmol

Diketahui PSEE yang diperoleh = 1,373 g
 = 1,373 g / 253 g/mol
 = 0,005426877 mol
 = 5,4269 mmol

sehingga rendemen yang diperoleh = 5,4269 mmol / 6 mmol
 = 90,44%

b. Perhitungan rendemen β -hidroksipikolinil serin etil heptanoil ester (PSEHE)

Persamaan reaksi :



Mula-mula :	0,4 mmol	0,6 mmol	
Reaksi :	0,4 mmol	0,4 mmol	0,4 mmol
<hr/>			
Sisa :	-	0,2 mmol	0,4 mmol

Diketahui PSEHE yang diperoleh = 0,1418 g
 = 0,1418 g / 366 g/mol
 = 0,00038743 mol
 = 0,3874 mmol

sehingga rendemen yang diperoleh = 0,3874 mmol / 0,4 mmol
 = 96,85%

c. Perhitungan rendemen β -hidroksipikolinil metil oktanoil serin ester (PSEOE)

Persamaan reaksi :

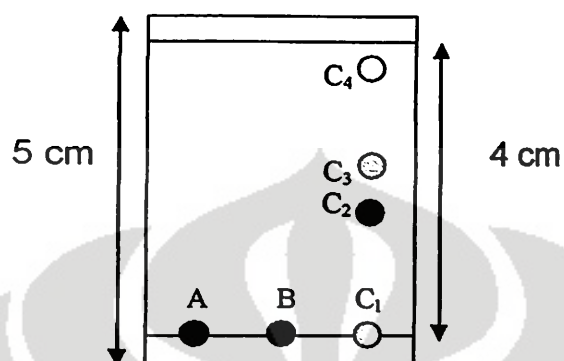
	PSEE	+	asam oktanoat	→	PSEOE
Mula-mula :	0,4 mmol		0,6 mmol		
Reaksi :	0,4 mmol		0,4 mmol		0,4 mmol
Sisa :	-		0,2 mmol		0,4 mmol

Diketahui PMOSE yang diperoleh = 0,1372 g
 = 0,1372 g / 380 g/mol
 = 0,00036105 mol
 = 0,0361 mmol

sehingga rendemen yang diperoleh = 0,0361 mmol / 0,4 mmol
 = 90,26%

Lampiran 3. Analisis KLT dan Perhitungan Rf

a. Analisis KLT dan perhitungan Rf PSEE



Keterangan : A = L-serin-etil ester (0 cm)

B = asam 3-hidroksipikolinat (0 cm)

C = sampel produk (0 ; 1,7 ; 2,6 ; 3,6 cm)

C₂ = spot dominan = PSEE

Jarak tempuh eluen (n-heksana : etil asetat 2:1) = 4 cm

Pengidentifikasi spot : lampu UV 254 nm; 365 nm dan larutan ninhidrin

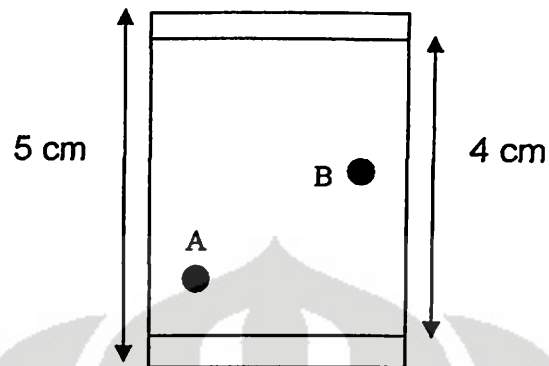
$$R_f = \frac{\text{jarak tempuh spot}}{\text{jarak tempuh eluen}}$$

$$R_f A = \frac{0 \text{ cm}}{4 \text{ cm}} = 0$$

$$R_f B = \frac{0 \text{ cm}}{4 \text{ cm}} = 0$$

$$R_f C_2 = 1,7 \text{ cm} / 4 \text{ cm} = 0,425$$

Analisis KLT dan perhitungan Rf PSEHE



Keterangan : A = PSEE (0,7 cm)

B = Sampel produk PSEHE (2,3 cm)

Jarak tempuh eluen (n-heksana : etil asetat 2 : 1) = 4 cm

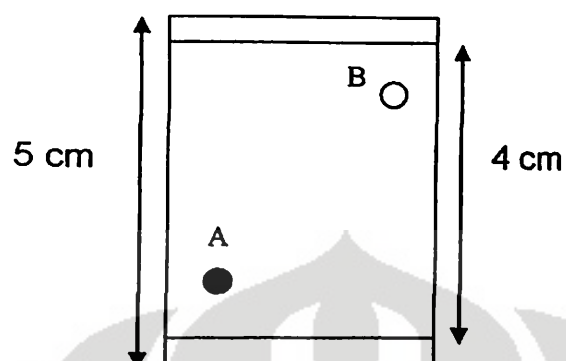
Pengidentifikasi spot : lampu UV 254 nm; 365 nm

$$R_f = \frac{\text{jarak tempuh spot}}{\text{jarak tempuh eluen}}$$

$$R_f A = 0,7 \text{ cm} / 4 \text{ cm} = 0,175$$

$$R_f B = 2,3 \text{ cm} / 4 \text{ cm} = 0,575$$

Analisis KLT dan perhitungan Rf PSEOE



Keterangan : A = PSEE (0,7 cm)

B = Sampel produk PSEOE (3,4)

Jarak tempuh eluen (n-heksana : etil asetat 2 : 1) = 4 cm

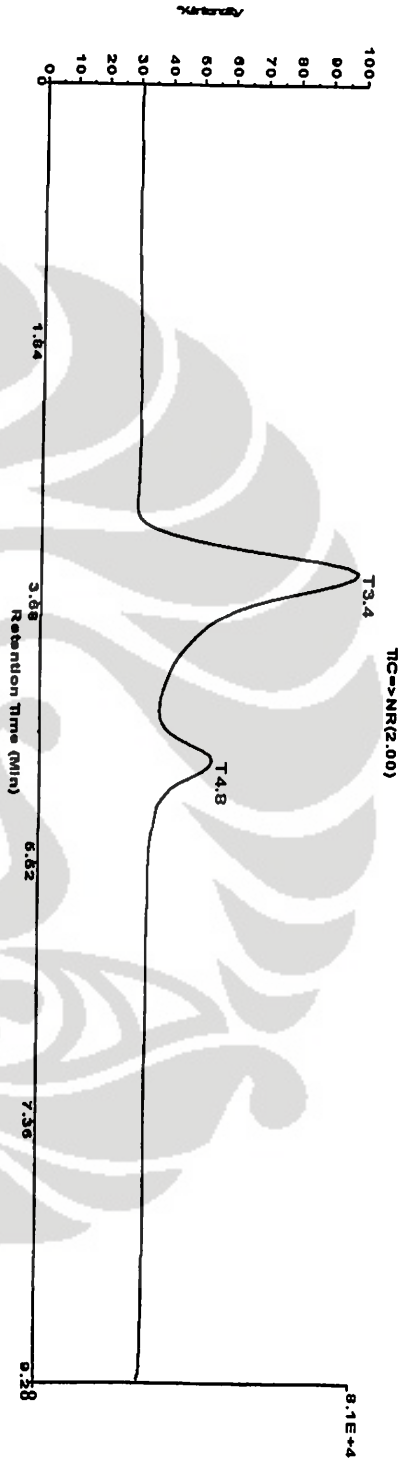
Pengidentifikasi spot : lampu UV 254 nm ; 365 nm

$$R_f = \frac{\text{jarak tempuh spot}}{\text{jarak tempuh eluen}}$$

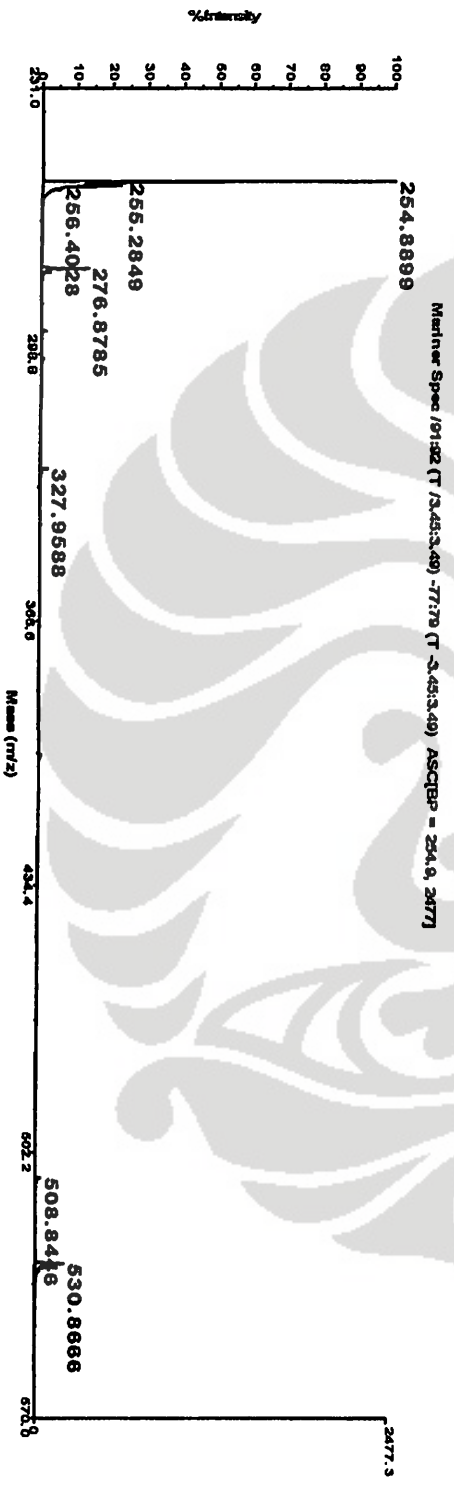
$$R_f A = 0,7 \text{ cm} / 4 \text{ cm} = 0,175$$

$$R_f B = 3,4 \text{ cm} / 4 \text{ cm} = 0,875$$

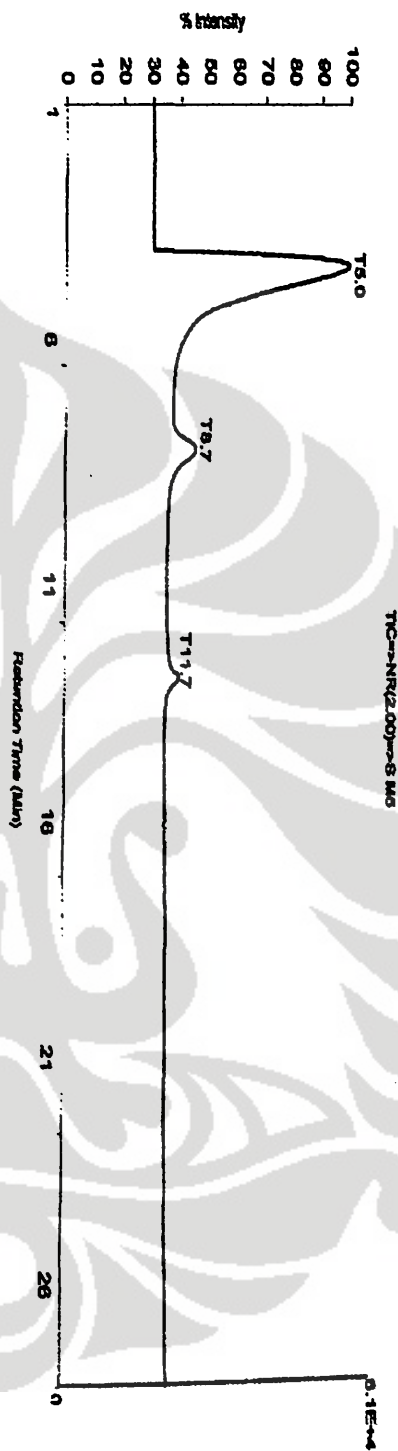
Lampiran 4.a Kromatogram dan spektra LC-MS PSEE



Index	Time	Lower Bound	Upper Bound	Height	Area
1	3.449967	3.065233	4.334567	81075	738413.67
2	4.795567	4.526500	5.295783	44943	128110.92

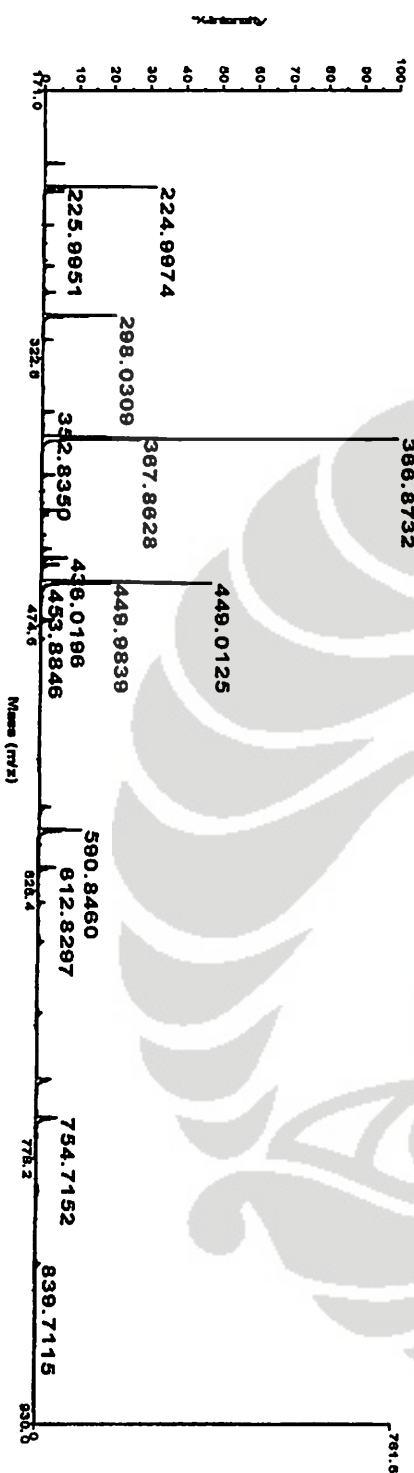


Lampiran 4.b Kromatogram dan spektra LC-MS PSEHE

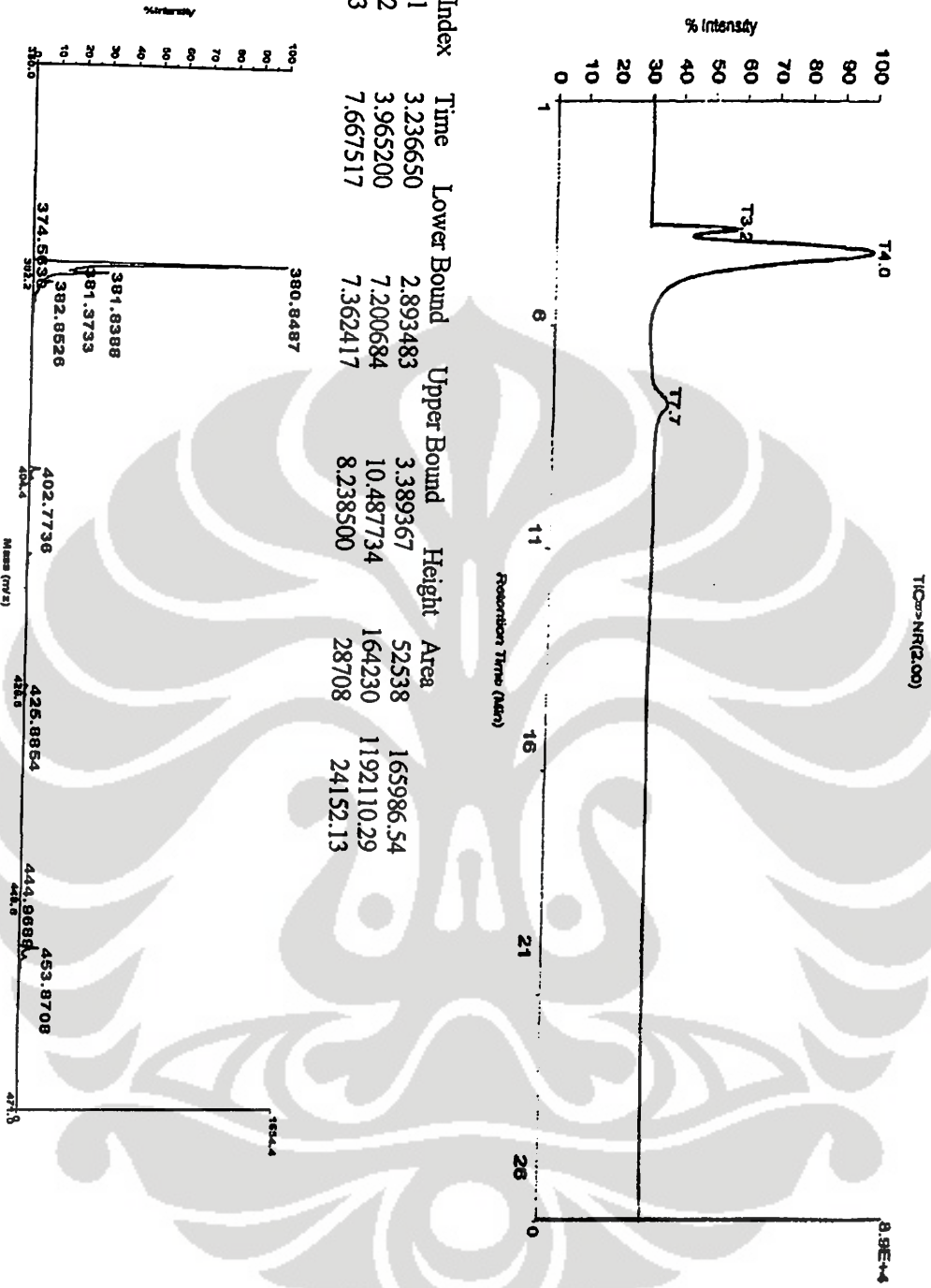


Index	Time	Lower Bound	Upper Bound	Height	Area
1	4.956450	8.5745	12.584584	150525	1499486.68
2	8.697334	8.277567	9.460933	36299	73235.13
3	11.672950	11.406067	12.129934	31198	14440.47

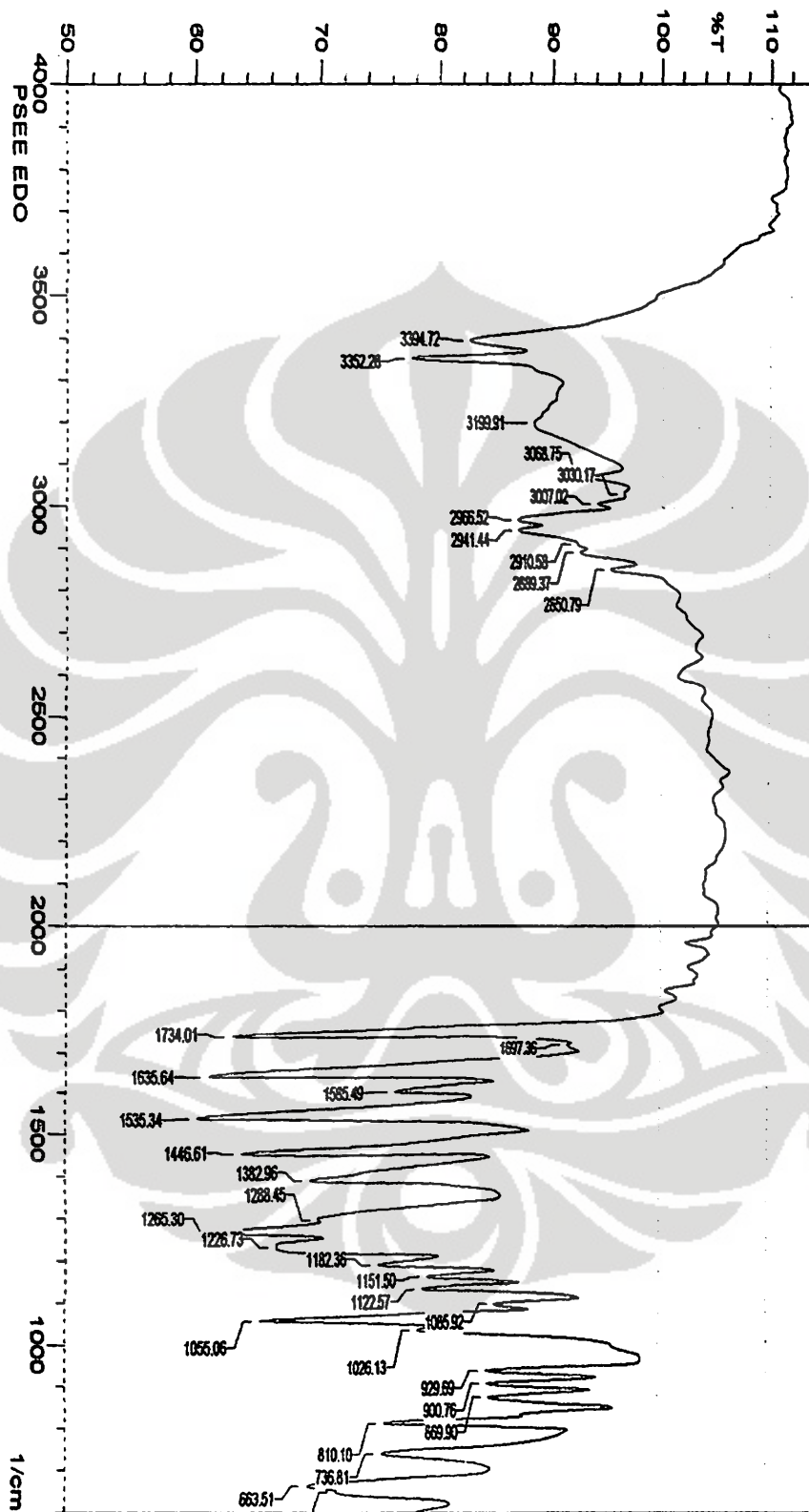
Method: Sepco /115:117 (T 4.34(4.43) -06:104 (T 4.34(4.43) ASCLBP = 366.9, 702)



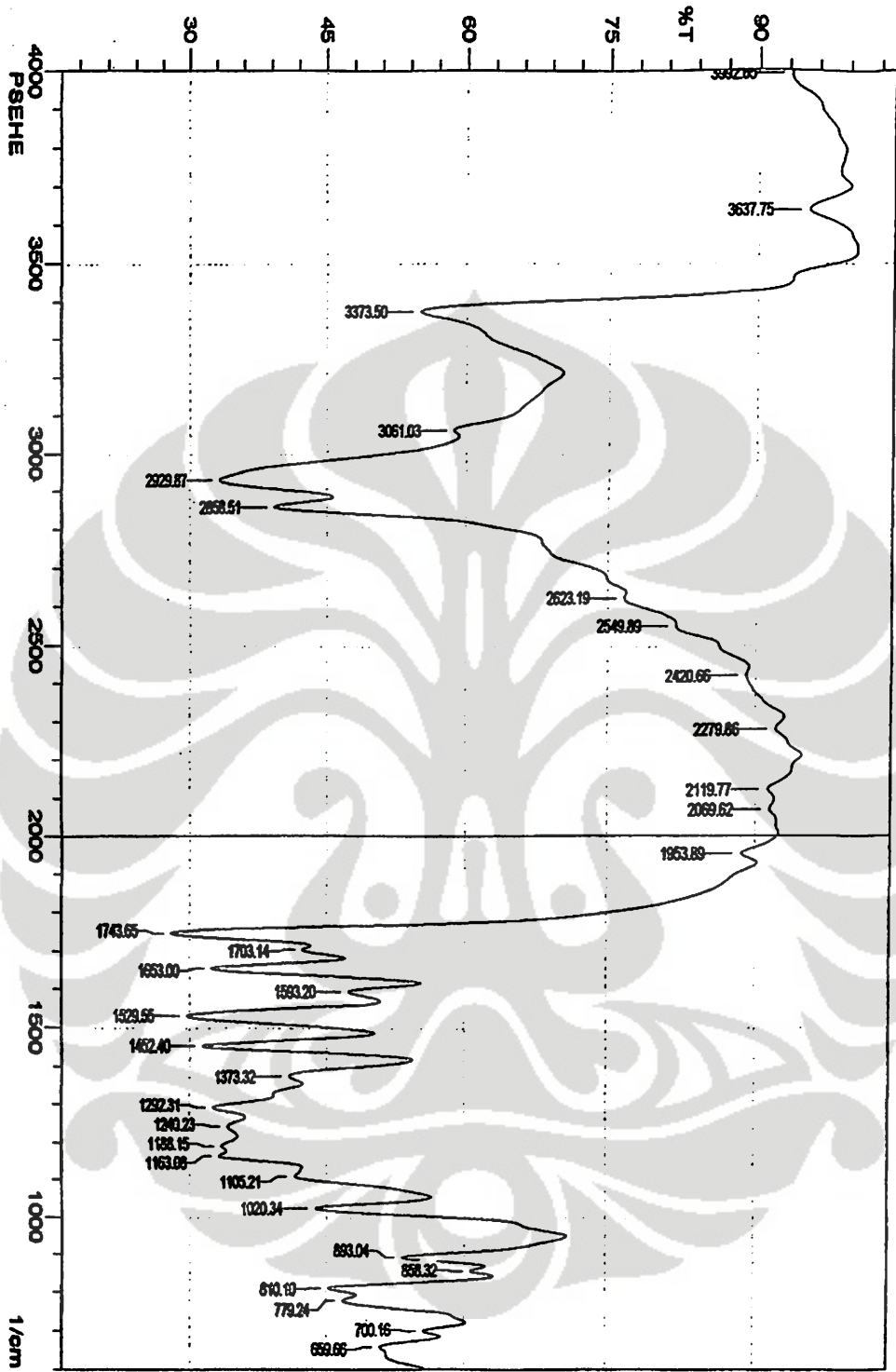
Lampiran 4.c Kromatogram dan spektra LC-MS PSEOE



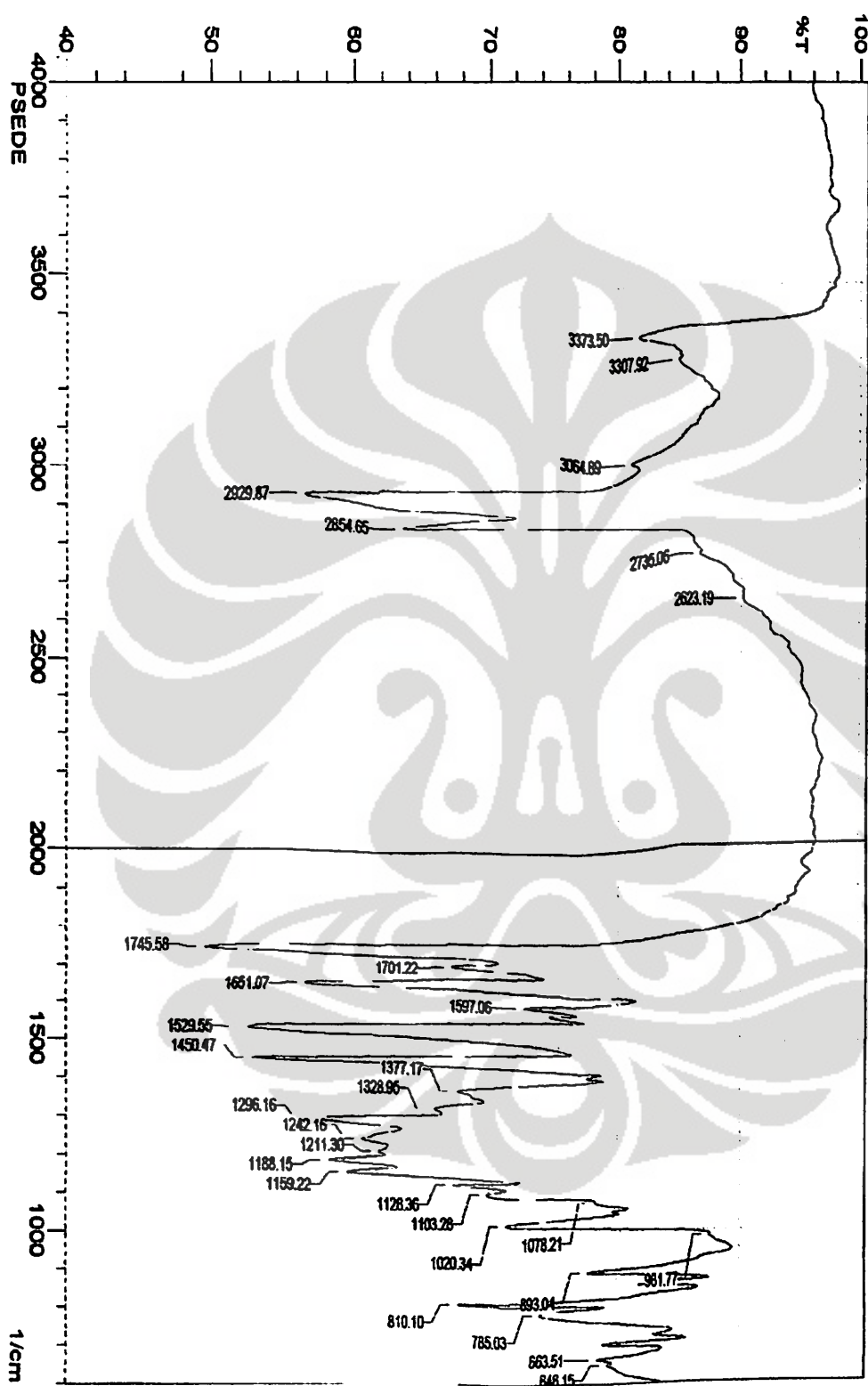
Lampiran 5.a Spektra FTIR PSEE



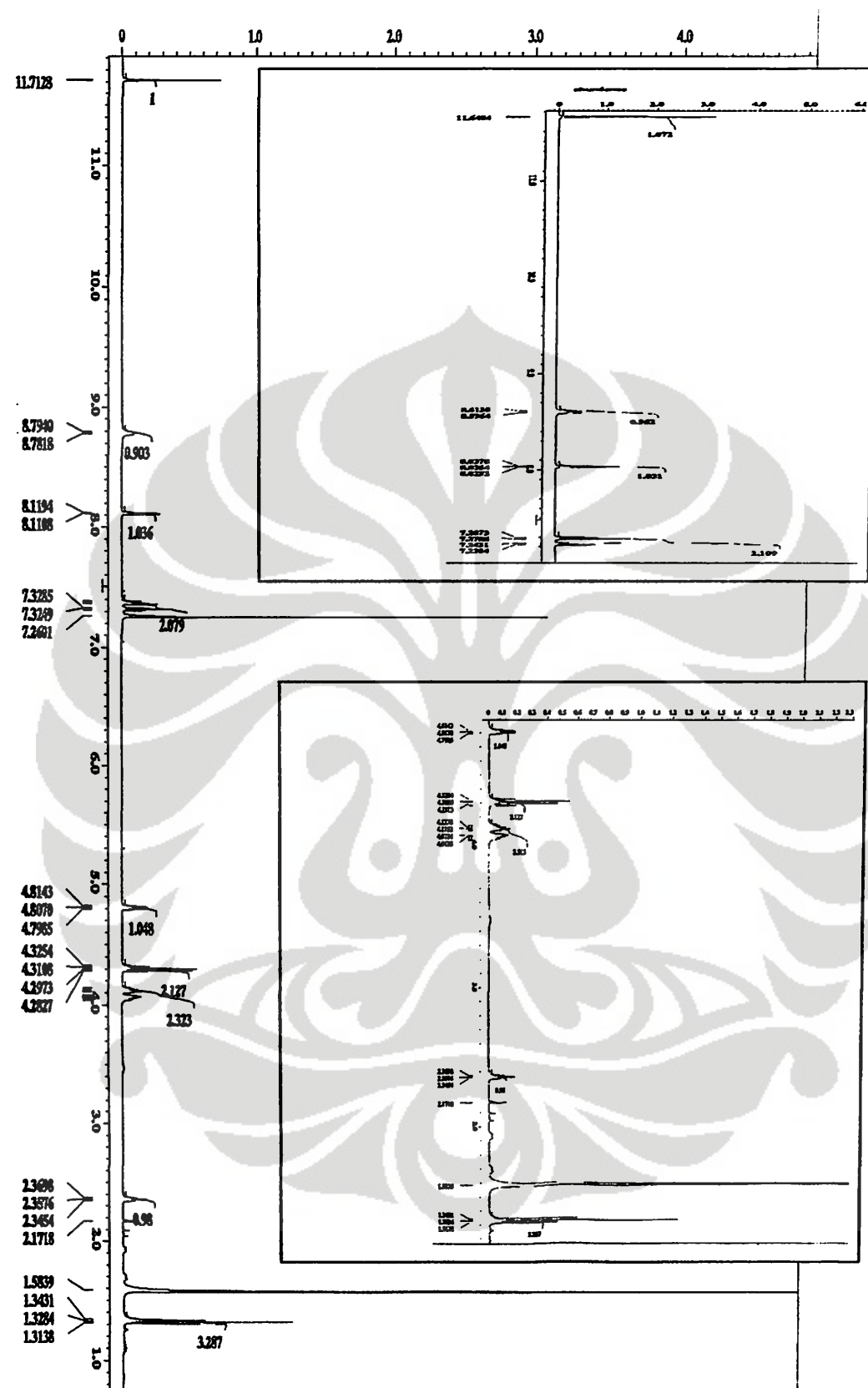
Lampiran 5.b Spektre FTIR PSEHE



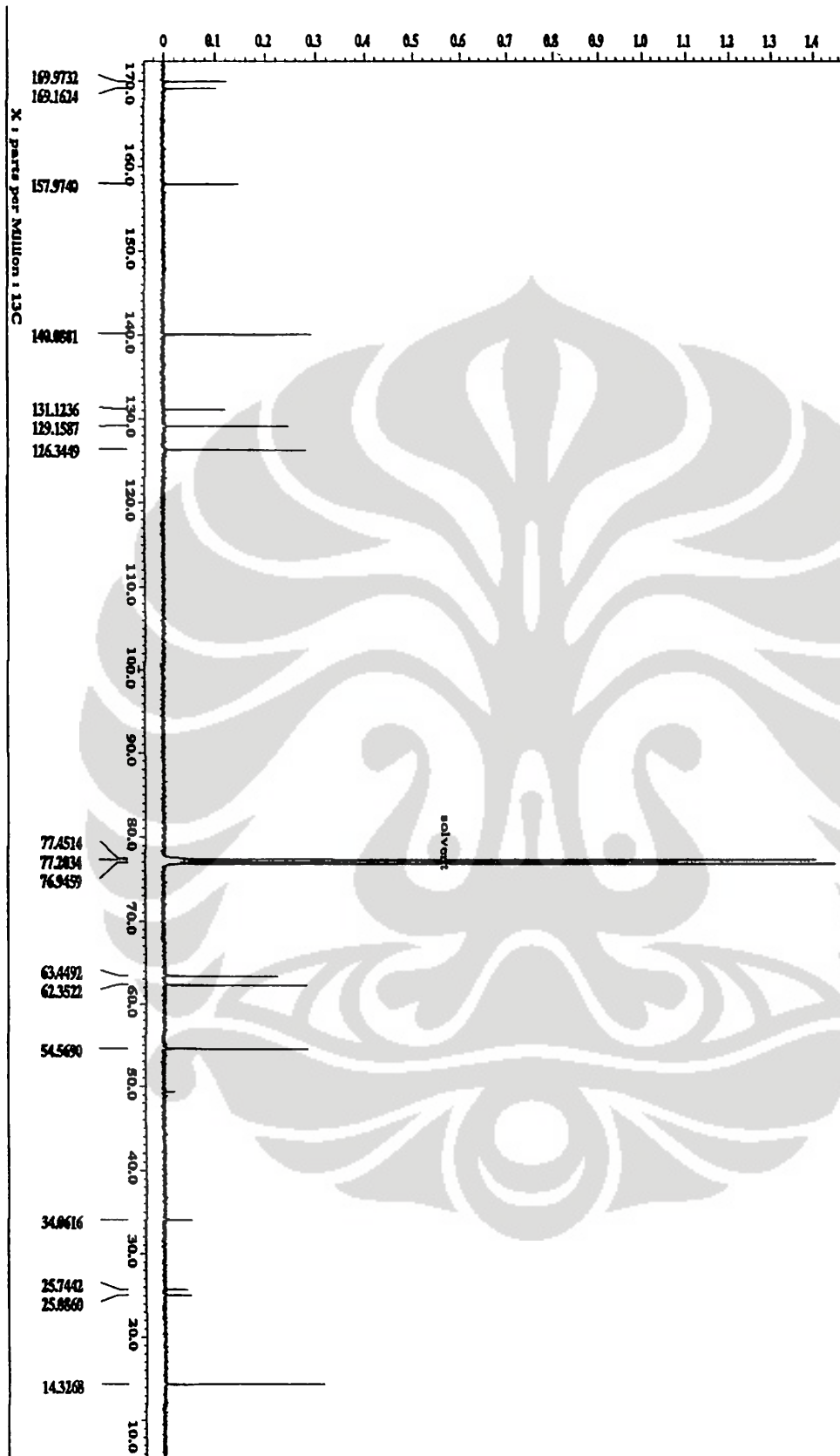
Lampiran 5.c Spektra FTIR PSEOE



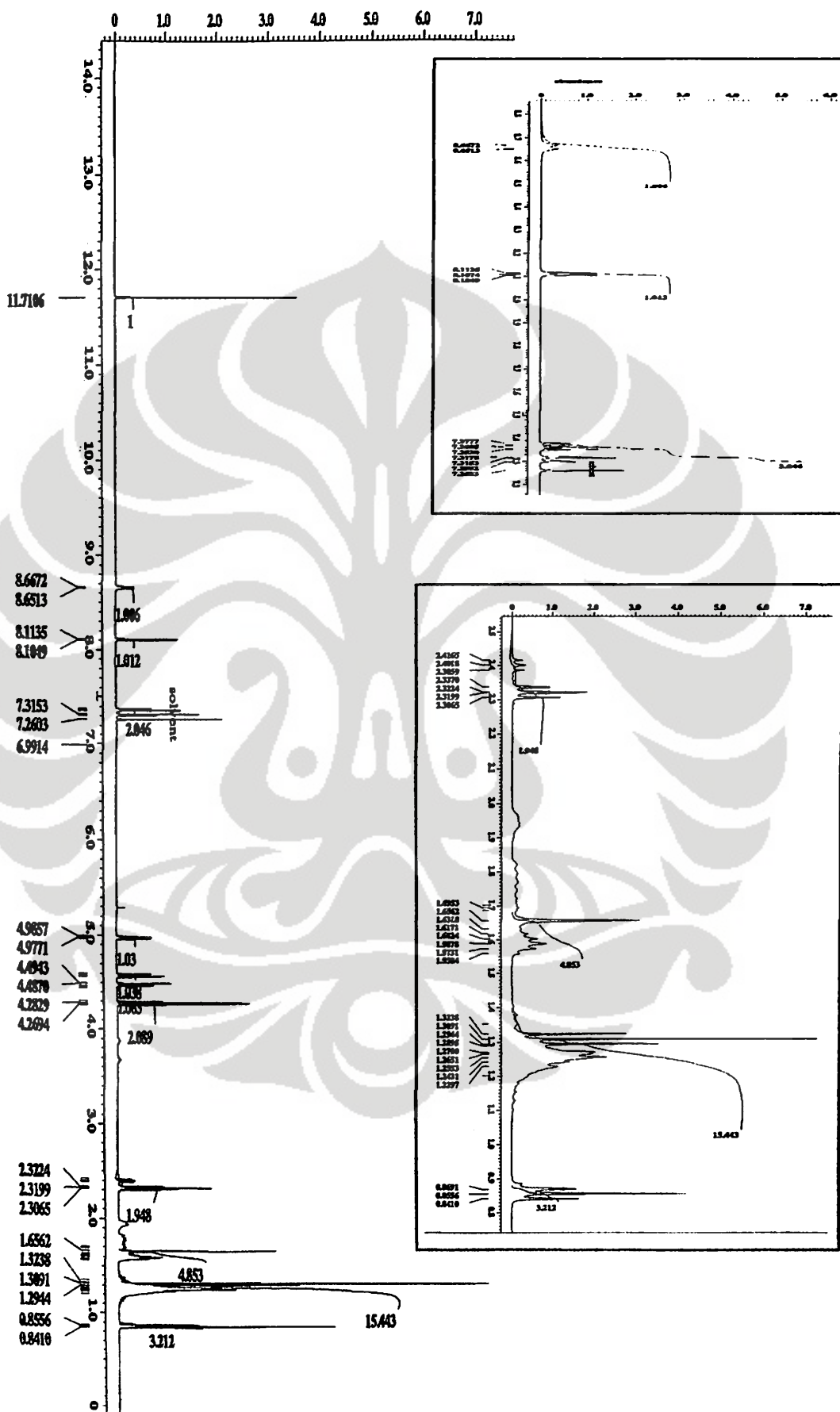
Lampiran 6.a. Data Spektre ^1H NMR PSEE



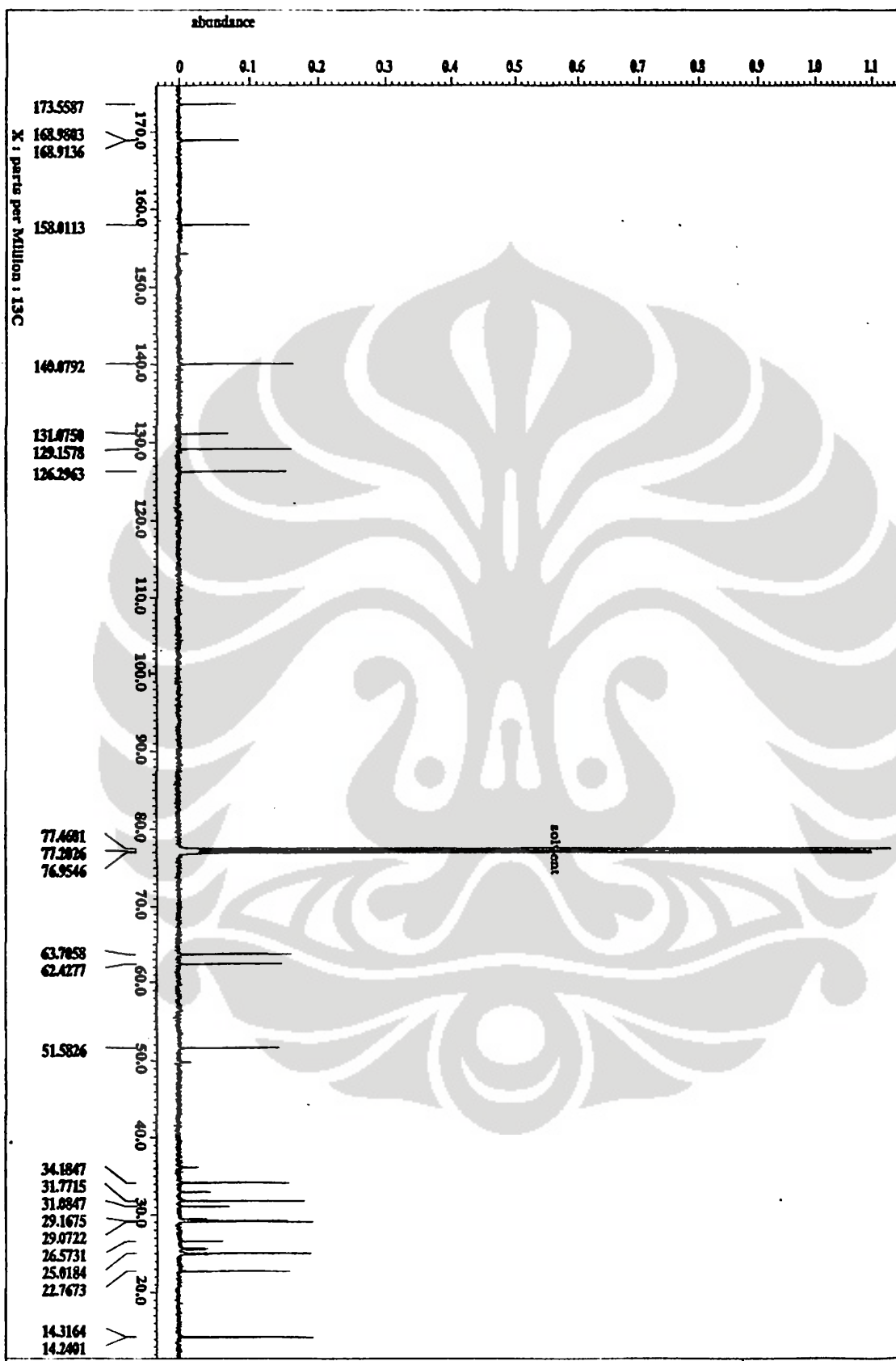
Lampiran 6.b. Data Spektra ¹³C NMR PSEE



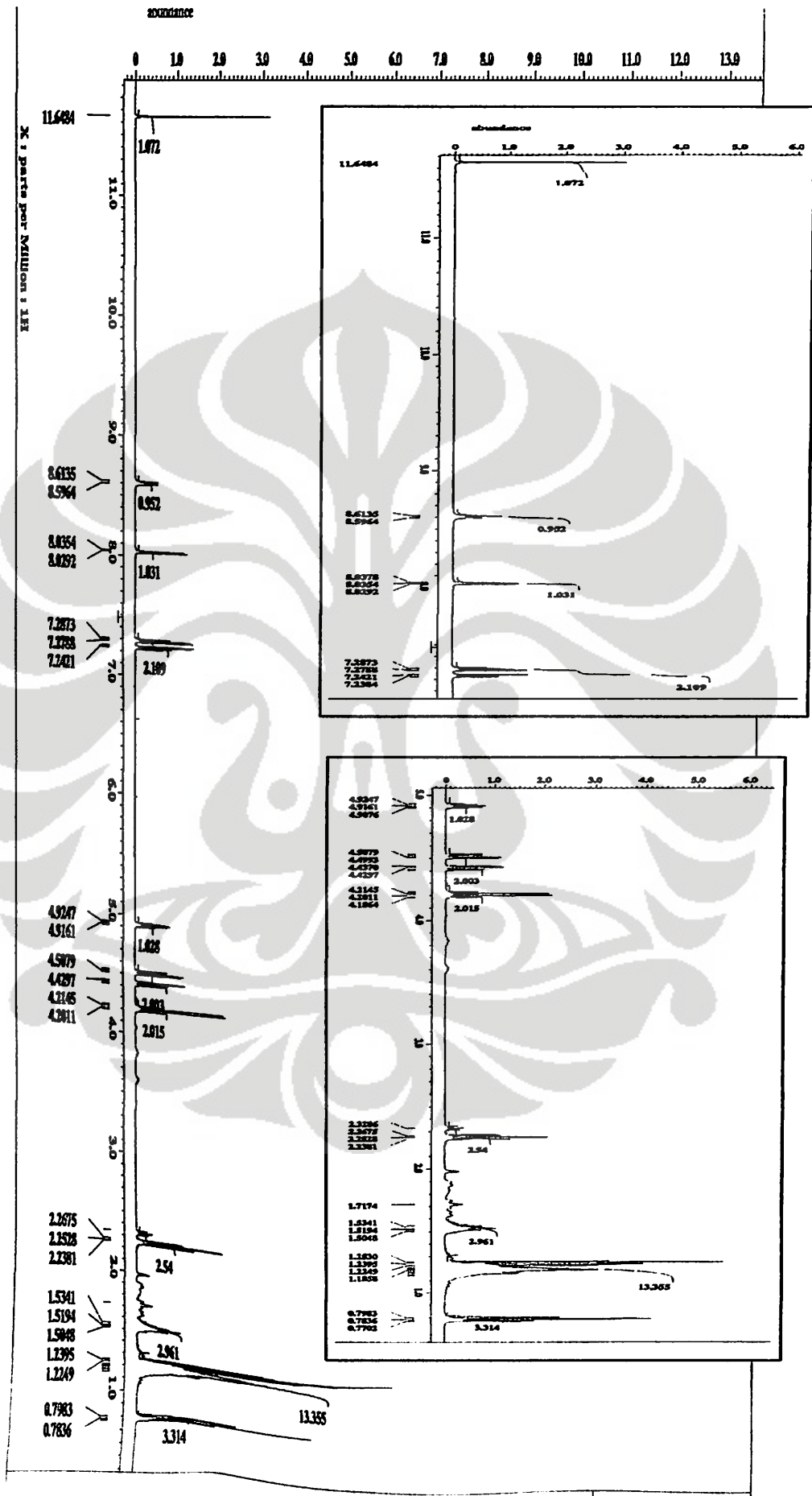
Lampiran.7.a. Data Spektre ¹H NMR PSEHE



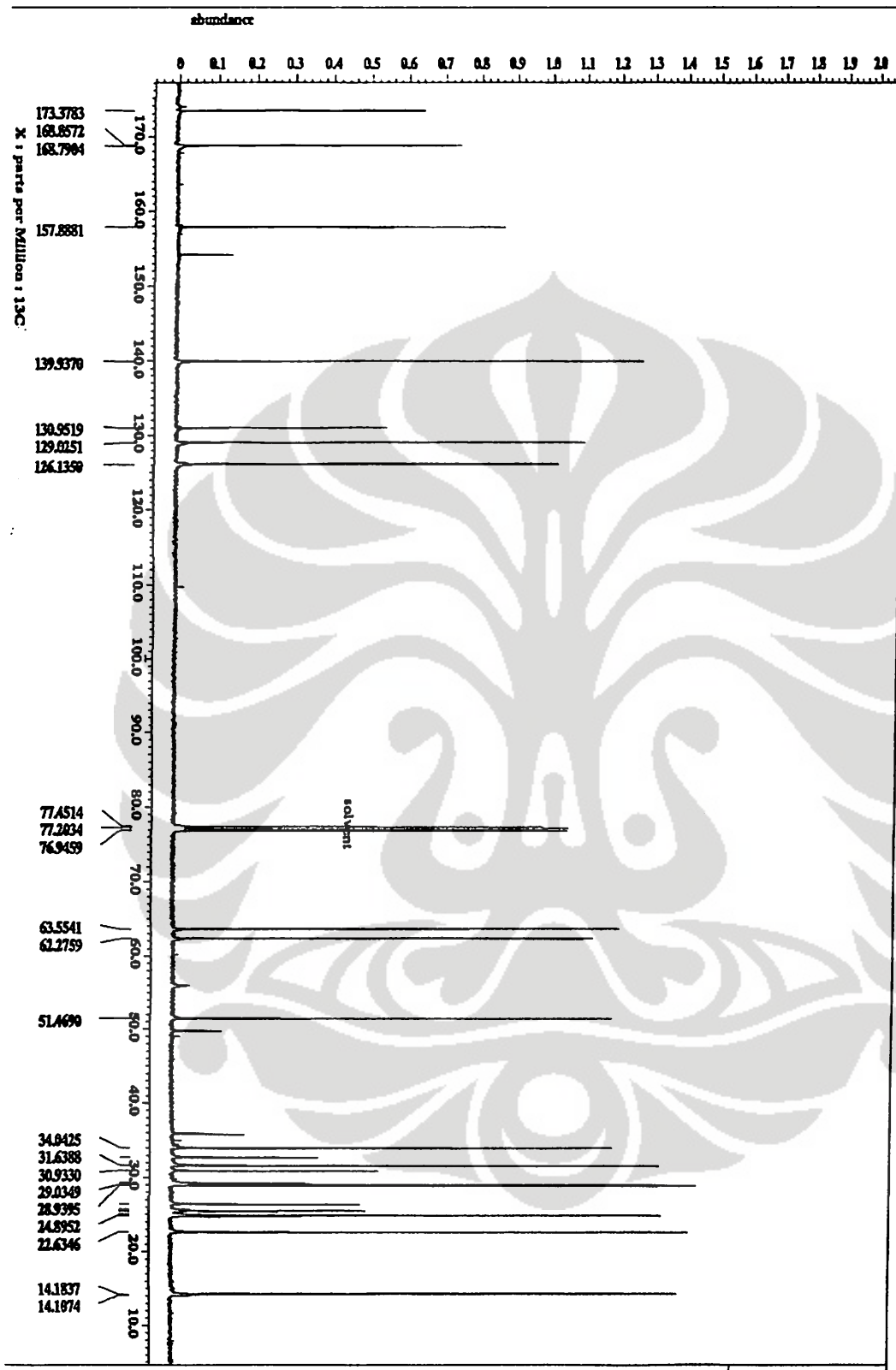
Lampiran 7.b. Data Spektre ¹³C NMR PSEHE



Lampiran 8.a. Data Spektre ¹H NMR PSEOF



Lampiran 8.b. Data Spektre ¹³C NMR PSEOE



Lampiran 9. Hasil Bioassay Sitotoksik terhadap Sel Murine Leukemia P 388

<p>Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung Jalan Ganesha 10, Bandung 40132</p>	
<p>Hasil Bioassay Sitotoksik terhadap Sel Murine Leukemia P388 [ex HSRRB Lot Number : 113098 seed (JCRB0017)]</p>	
Tanggal penerimaan :	2 Oktober 2007
Tanggal pengerjaan :	6 November 2007
Nama sampel :	PSEHE
Nilai IC ₅₀ :	38,0 µg/ml
Analisis :	suam. d-e.
<p>Pengelola, Astaya D. Juliatyaty</p>	

<p>Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung Jalan Ganesha 10, Bandung 40132</p>	
<p>Hasil Bioassay Sitotoksik terhadap Sel Murine Leukemia P388 [ex HSRRB Lot Number : 113098 seed (JCRB0017)]</p>	
Tanggal penerimaan :	2 Oktober 2007
Tanggal pengerjaan :	6 November 2007
Nama sampel :	PSEDE
Nilai IC ₅₀ :	53,0 µg/ml
Analisis :	suam. d-e.
<p>Pengelola, Astaya D. Juliatyaty</p>	

Lampiran 9. Perhitungan nilai putaran optis senyawa PSEHE:

- Nilai pengukuran putaran optis (β) = + 0,1
- Konsentrasi Larutan (C) = 1,6 g/100 mL
- Panjang tabung (l) = 2,5 dm
- Suhu pengukuran = 30 °C.
- Maka sudut α rotasi spesifik adalah =
- Rumus :

$$\beta = \frac{\alpha l C}{1000}$$

$$0,1 = \frac{\alpha \times 2,5 \times 1,6}{1000}$$

$$\alpha = \frac{0,1 \times 1000}{2,5 \times 1,6} = 25$$

- Maka sudut rotasi spesifik α pada T = 30 °C atau $[\alpha]_D^{30}$ senyawa PSEHE = + 25

Lampiran 10. Perhitungan putaran optis senyawa PSEOE

- Nilai pengukuran putaran optis (β) = + 0,2
- Konsentrasi Larutan (C) = 1,6 g/100 mL
- Panjang tabung (l) = 2,5 dm
- Suhu pengukuran = 30 °C
- Maka sudut α rotasi spesifik adalah =
- Rumus :

$$\beta = \frac{\alpha l C}{1000}$$

$$0,2 = \frac{\alpha \times 2,5 \times 1,6}{1000}$$

$$\alpha = \frac{0,2 \times 1000}{2,5 \times 1,6} = 50$$

Maka sudut rotasi spesifik α pada T = 30 °C atau $[\alpha]_D^{30}$ senyawa PSEOE = + 50