



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**SINTESIS DAN UJI AKTIVITAS TURUNAN SULOKRIN**

**TESIS**

**KRISTIANI NATALIA**  
**0806477150**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**  
**PROGRAM PASCA SARJANA**  
**DEPOK**  
**DESEMBER 2010**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**SINTESIS DAN UJI AKTIVITAS TURUNAN SULOKRIN**

**TESIS**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Master Sains**

**KRISTIANI NATALIA  
0806477150**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI KIMIA  
DEPOK  
DESEMBER 2010**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.



Nama : Kristiani Natalia  
NPM : 0806477150  
Tanda Tangan :  
Tanggal : 22-Desember-2010

## HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :  
Nama : Kristiani Natalia  
NPM : 0806477150  
Program Studi : Kimia  
Judul Tesis : Sintesis dan Uji Aktivitas Turunan Sulokrin

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Sains pada Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing : 1. Dr. Emil Budianto (.....)  
2. Dr. Muhammad Hanafi (.....)

Penguji : 1. Prof. Dr. Soleh Kosela, M.Sc (.....)  
2. Dr. Herry Cahyana (.....)  
3. Dr. Endang Saepudin (.....)  
4. Prof. Dr. Usman Sumo F.T (.....)

Ditetapkan di : Depok  
Tanggal : 22-Desember-2010



## KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yesus Kristus, karena atas kasih karunia dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan tesis ini. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Master Sains Jurusan Kimia pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan tesis ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan tesis ini.

Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

- (1) Dr. Emil Budianto, selaku dosen pembimbing I dan Dr. Muhammad Hanafi, selaku pembimbing II yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini;
- (2) Dr. Endang Saepudin, selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Kimia, Program Pasca Sarjana Universitas Indonesia;
- (3) Rizna Triana Dewi, M.Si, yang telah memberikan kesempatan, arahan, serta fasilitas kepada penulis untuk menyelesaikan tesis ini;
- (4) Dr. L. Broto S. Kardono, Apt., Apu., selaku kepala Pusat Penelitian Kimia-LIPI yang telah memberikan kesempatan melakukan penelitian di Laboratorium Sintesis Organik, Bidang Bahan Alam, Pangan dan Farmasi, Puslit Kimia – LIPI
- (5) Saudara/i Ahmad Darmawan M.Si, Teni M.Sc, Sofa Fajriah S.Si, Puspa Dewi M.Eng, Minarti S.Si, Hani Mulyani S.Si, Gozali, Ngadiman, Lia, dan Mega, yang telah banyak membantu penulis melakukan penelitian tugas akhir;
- (6) Papa, Mama, Kakak, Adik yang telah memberikan bantuan dukungan doa, material dan moral; Ibu Lily dan Bapak Arwan Gunawan dan semua keluarga terkasih atas dukungan doa dan semangatnya;
- (7) Sahabat-sahabat terkasih Helva Satria Jaya, Meylina Depari, Meyida, Lie Ha, Dini, Rumintang, Fenny dan teman-teman kelompok tumbuh bersama atas

doa dan semangat yang diberikan kepada penulis;

Seluruh Dosen dan karyawan jurusan kimia FMIPA-UI. Rekan-rekan mahasiswa S2 yang telah memberi bantuan dan dorongan semangat kepada penulis. Semua pihak yang telah memberikan bantuan selama penelitian dan penyusunan tesis ini.

Akhir kata, saya berharap Tuhan Yesus Kristus berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan Ilmu Pengetahuan.



**Penulis**  
**2010**

## ABSTRAK

Nama : Kristiani Natalia  
Program Studi : Kimia  
Judul : Sintesis dan Uji Aktivitas Turunan Sulokrin

Senyawa turunan sulokrin metil 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1 karboksilat [A] dan asam 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1 karboksilat [B] telah berhasil disintesis melalui reaksi adisi konyugasi alkohol (siklisasi) dan hidrolisis ester secara simultan. Sintesis ini dilakukan dengan mereaksikan sulokrin dalam pelarut aseton dengan basa KOH dalam akuades dengan perbandingan mol 1:1 pada suhu 100 °C menghasilkan rendemen masing-masing sebesar 65,56 % untuk senyawa [A] dan 11,04 % untuk senyawa [B]. Hasil optimasi proses sintesis melalui variasi perbandingan mol bahan baku awal sulokrin terhadap basa KOH dengan perbandingan berturut-turut 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; dan 1:5, memberikan nilai rendemen tertinggi 65,56 % untuk senyawa [A] dengan perbandingan 1:1 dan 40,32 % untuk senyawa [B] dengan perbandingan 1:5. Identifikasi senyawa hasil sintesis dilakukan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis dan dianalisis struktur molekulnya dengan menggunakan spektrofotometer FT-IR, spektrometer LC-MS dan NMR (<sup>1</sup>H-NMR dan <sup>13</sup>C-NMR). Uji toksisitas metode *brine shrimp lethality test* (BSLT) terhadap senyawa [A] diperoleh nilai LC<sub>50</sub> sebesar 32,84 µg/mL. Uji sitotoksitas terhadap sel kanker leukemia *HL60* diperoleh nilai LC<sub>50</sub> untuk senyawa [A] sebesar 89,40 µg/mL.

Kata Kunci : Sulokrin, siklisasi, hidrolisis, sel kanker leukemia *HL60*  
xi+74 halaman ; 11 gambar; 7 tabel  
Daftar Pustaka : 59 (1961-2010)

## ABSTRACT

Name : Kristiani Natalia  
Program Study : Chemistry  
Title : Synthesis and Activity Test of Sulochrin Derivatives

The derivative sulochrin compounds (methyl 3,8-dihydroxy-6-methyl-9-oxo-9H-xanthene-1-carboxylate [A] and 3,8-dihydroxy-6-methyl-9-oxo-9H-xanthene-1-carboxylic acid [B]) have been synthesized by conjugating addition of alcohol (cyclization) and ester hydrolysis simultaneously. These two compounds were carried out in one step reaction between sulochrin in acetone and potassium hydroxide in distilled water by mol ratio of 1:1 yielded 65.56 % of [A] and 11.04 % of [B]. Optimization has been done by varying mol proportion of sulochrin toward KOH of 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; and 1:5, respectively. The optimum yields of [A] and [B] were 65.56 % for 1:1 and 40.32 % for 1:5. The structure of products were analyzed and identified by TLC, FT-IR spectrophotometer, LC-MS and NMR spectrometer. The  $LC_{50}$  value of brine shrimp lethality test of [A] compound was 32.84  $\mu\text{g/mL}$ . Cytotoxicity test on HL60 cells of [A] compound yielded  $IC_{50}$  89.40  $\mu\text{g/mL}$ .

Key Words : Sulochrin, cyclization, hydrolysis, cytotoxic cell HL-60.  
xi+74 pages ; 11 pictures; 7 tables  
Bibliography : 53 (1961-2010)

## DAFTAR ISI

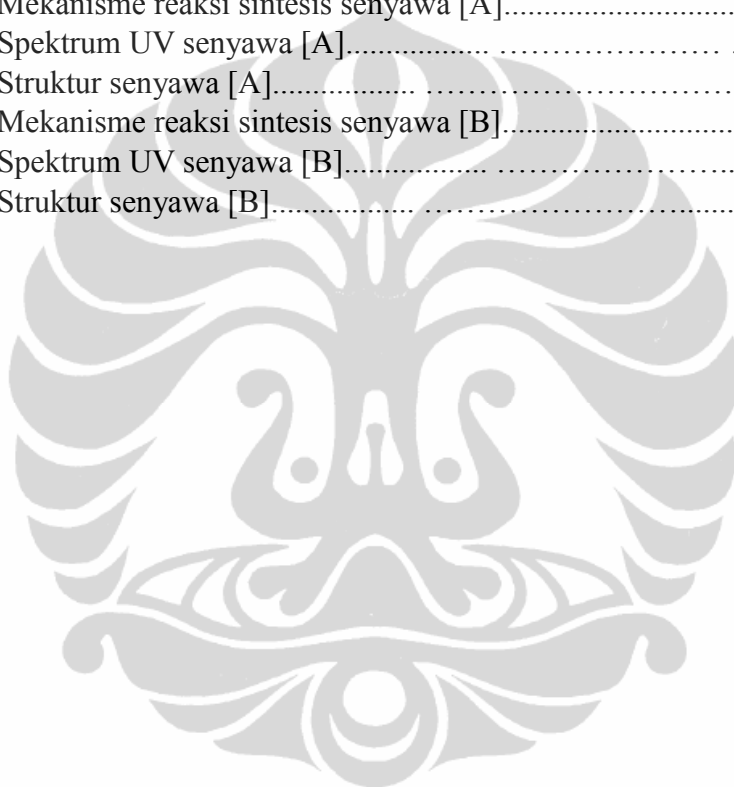
HALAMAN JUDUL .....	i
LEMBAR PENGESAHAN .....	ii
KATA PENGANTAR .....	iii
ABSTRAK .....	v
DAFTAR ISI .....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	ix
DAFTAR LAMPIRAN .....	xi
<b>1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
1.3 Manfaat Penelitian.....	4
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>5</b>
2.1 Sulokrin.....	5
2.2 Xanthon.....	5
2.3 Teori Asam basa.....	7
2.4 Reaksi Hidrolisis Ester .....	8
2.5 Reaksi Adisi Konyugasi dan Adisi Langsung.....	10
2.6 Kanker .....	11
2.7 Uji Bioaktivitas .....	12
2.7.1 <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> .....	12
2.7.2 Uji Sitotoksisitas.....	13
<b>3. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>15</b>
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	15
3.2 Bahan dan Alat .....	15
3.2.1 Bahan.....	15
3.2.2 Peralatan.....	15
3.3 Prosedur Penelitian.....	16
3.3.1 Sintesis, Identifikasi, dan Karakterisasi Senyawa Turunan Sulokrin.....	16
3.3.1.1 Sintesis Senyawa Turunan Sulokrin .....	16
3.3.1.2 Identifikasi dan Karakterisasi Senyawa .....	17
3.3.2 Uji Toksisitas dengan Larva Udang.....	19
3.3.2.1 Penetasan Larva Udang .....	19
3.3.2.2 Persiapan Larutan yang akan diuji .....	19
3.3.2.3 Uji Toksisitas Metode Meyer .....	19
3.3.3 Uji Toksisitas Sel Kanker <i>YMB-1</i> , <i>HL60</i> , dan Sel Kanker <i>KB</i> secara <i>in vitro</i> .....	20

<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>22</b>
4.1 Sintesis Senyawa Turunan Sulokrin.....	22
4.1.1 Sintesis Senyawa [A].....	24
4.1.2 Sintesis Senyawa [B].....	32
4.2 Optimasi Sintesis Senyawa [A] dan Senyawa [B].....	37
4.3 Uji Bioaktivitas Senyawa [A].....	38
4.3.1 Uji Brine Shrimp Lethality Test (BSLT).....	38
4.3.2 Uji Toksisitas Sel Kanker <i>YMB-1</i> , <i>HL60</i> , dan Sel Kanker <i>KB</i> secara <i>in vitro</i> .....	38
<b>5. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>41</b>
5.1 Kesimpulan.....	41
5.2 Saran.....	42
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>43</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>48</b>



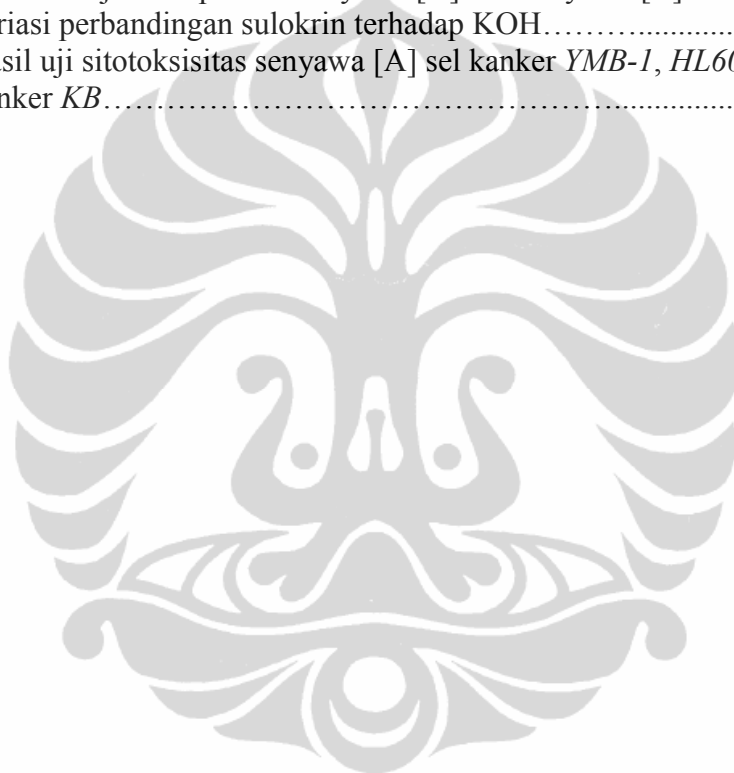
## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Struktur kimia senyawa sulokrin.....	5
Gambar 2.2. Kerangka dasar struktur senyawa xanthon.....	6
Gambar 2.3. Mekanisme pembentukan xanthon dari sumber alami.....	7
Gambar 2.4. Reaksi reduksi MTT menjadi formazan.....	14
Gambar 4.1. Struktur sulokrin sebagai senyawa karbonil tak jenuh $\alpha$ , $\beta$ -.....	22
Gambar 4.2. Mekanisme reaksi sintesis senyawa [A].....	25
Gambar 4.3. Spektrum UV senyawa [A].....	27
Gambar 4.4. Struktur senyawa [A].....	30
Gambar 4.5. Mekanisme reaksi sintesis senyawa [B].....	33
Gambar 4.6. Spektrum UV senyawa [B].....	34
Gambar 4.7. Struktur senyawa [B].....	36



## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Adisi konyugasi pada senyawa karbonil tak jenuh $\alpha$ , $\beta$ -.....	10
Tabel 4.1. Daftar daerah spektrum gugus fungsi senyawa [A].....	29
Tabel 4.2. Data pergeseran kimia dari spectrum HMQC dan HMBC senyawa [A] .....	31
Tabel 4.3. Daftar daerah spektrum gugus fungsi senyawa [B].....	35
Tabel 4.4. Data pergeseran kimia dari spectrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa [B] .....	36
Tabel 4.5. Persentasi jumlah produk senyawa [A] dan senyawa [B] dengan variasi perbandingan sulokrin terhadap KOH.....	37
Tabel 4.6. Hasil uji sitotoksitas senyawa [A] sel kanker <i>YMB-1</i> , <i>HL60</i> , dan sel kanker <i>KB</i> .....	39





## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	48
Lampiran 2. Perhitungan rendemen hasil reaksi sintesis senyawa [A] dan [B]..	49
Lampiran 3. Spektrum FT-IR senyawa metil 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-karboksilat [A].....	59
Lampiran 4. Spektrum FT-IR senyawa asam 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-karboksilat [B].....	60
Lampiran 5. Hasil spektrofotometer LC-MS senyawa [A] .....	61
Lampiran 6. Hasil spektrofotometer LC-MS senyawa [B] .....	62
Lampiran 7. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ , $^{13}\text{C-NMR}$ dan korelasi H-C berdasarkan spektrum HMQC serta HMBC Senyawa [A].....	63
Lampiran 8. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ Senyawa [B].....	67
Lampiran 9. Data Hasil Uji <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT) dan Kurva Linear Korelasi antara Log Konsentrasi dengan mortalitas <i>A. salina</i> terhadap Senyawa [A].....	68
Lampiran 10. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ , $^{13}\text{C-NMR}$ dan korelasi H-C berdasarkan spektrum HMQC serta HMBC Senyawa Sulokrin.....	69

## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Berdasarkan catatan Badan Kesehatan Dunia, WHO (World Health Organization), mengenai jumlah penderita kanker di dunia terjadi penambahan setiap tahun sekitar 6,25 juta orang dan diperkirakan dalam 10 tahun mendatang 9 juta orang akan meninggal akibat penyakit yang menakutkan ini. Jumlah penderita kanker di dunia sebagian besar terdapat di negara-negara berkembang dan Indonesia sebagai salah satu negara berkembang, diperkirakan setiap tahunnya memiliki angka prevalensi yang tinggi yaitu 100 penderita kanker yang baru dari setiap 100.000 jumlah penduduk (Yayasan Kanker Indonesia, 2006).

Fakta yang ada dari penambahan jumlah penderita kanker yang terjangkau setiap tahun menandakan bahwa masalah tersebut dipicu oleh kemajuan peradaban yang semakin pesat dalam berbagai bidang yang ada hubungannya dengan penyebab kanker yang tidak dapat dihindari. Sebagian besar timbulnya kanker disebabkan oleh gaya hidup yang tidak sehat seperti kebiasaan makan tidak seimbang, kebiasaan merokok dan minum alkohol, paparan bahan radioaktif atau sinar matahari yang berlebihan, dan pencemaran lingkungan oleh limbah bahan berbahaya. Hal-hal tersebut dapat memberi kontribusi dalam memperburuk kondisi kesehatan masyarakat saat ini dan memberikan akibat munculnya berbagai jenis kanker sebagai faktor dominan penyebab kematian seseorang (Wikipedia, 2010; Siswondono, 2004)

Kanker merupakan suatu penyakit sel yang ditandai dengan hilangnya fungsi kontrol sel terhadap regulasi daur sel maupun fungsi homeostatis sel pada organisme multiseluler. Dengan kegagalan tersebut, sel tidak dapat berproliferasi secara normal. Akibatnya, sel akan berproliferasi terus-menerus sehingga menimbulkan pertumbuhan jaringan yang abnormal. Pertumbuhan kanker merupakan sebuah proses mikroevolusioner yang dapat berlangsung selama

**Universitas Indonesia**

beberapa bulan atau beberapa tahun. Proses pertumbuhan ini dinamakan karsinogenesis. Usaha penyembuhan penyakit kanker sangat sulit karena kompleksnya mekanisme molekuler yang menyertainya

(<http://ccrcfarmasiugm.wordpress.com/ensiklopedia-kanker/kanker/>).

Perkembangan yang pesat dari jumlah penderita kanker yang mengalami kematian mendorong berbagai upaya dalam melakukan penelitian, penemuan, dan produksi obat untuk diagnosis, pengobatan, maupun pencegahan yang lebih tepat. Penelitian tentang berbagai obat yang berpotensi sebagai antikanker telah dilakukan mulai dari isolasi bahan alam sampai dengan sintesis senyawa obat baru. Senyawa obat yang diperoleh dari hasil isolasi bahan alam dari berbagai sumber seperti tumbuhan, hewan, maupun mikroorganisme terdapat dalam jumlah yang terbatas. Kemajuan teknologi memungkinkan untuk melakukan sintesis senyawa obat baru berdasarkan modifikasi struktur antibiotik yang sebelumnya telah ditemukan secara alamiah dari hasil isolasi bahan alam. Penemuan obat baru dengan cara pengembangan struktur senyawa induk yang telah diketahui aktivitasnya diyakini lebih ekonomis, efisien, dan sederhana, sehingga pengembangan sintesis senyawa obat baru tersebut dapat memiliki aktivitas antikanker mendekati aktivitas senyawa aslinya atau lebih aktif (Siswandono & Soekardjo, 2000; Patrick, 2001).

Beberapa obat antikanker yang telah dikembangkan saat ini antara lain berupa obat yang merangsang diferensiasi sel sehingga akan terjadi perubahan sifat dari sel kanker yang ganas menjadi sel jinak, obat yang dapat meningkatkan efektivitas radiasi dan obat yang mengubah respon imun sel kanker dengan sel sehat. Selain itu, telah banyak obat-obatan yang dikembangkan berdasarkan aktivitas molekuler dari sel kanker. Namun, obat-obatan tersebut mengalami permasalahan dalam hal resistensi dan toleransi obat serta selektivitas obat itu sendiri disamping dari berbagai efek samping yang dapat ditimbulkan (<http://ccrcfarmasiugm.wordpress.com/ensiklopedia-kanker/kanker/>).

Sulokrin adalah metabolit yang diisolasi dari sejumlah jamur seperti *Aspergillus* dan *Penicillium sp.* Senyawa ini berperan sebagai inhibitor spesifik dari degranulasi eosinophil yang berperan penting dalam patofisiologi dari penyakit-penyakit alergi (Ohashi et al. 1999) dan juga menghambat aktivasi eosinophil dan chemotaxis (Ohashi et al. 1998). Pengembangan senyawa turunan sulokrin sebagai antikanker juga dikembangkan karena melalui reaksi kimia khususnya dengan larutan basa dapat membentuk kerangka xanthon (Roberts, 1961; Denisova-D & Glyzin, 1982). Beberapa xanthon yang ditemukan diantaranya memiliki sifat aktif biologis, misalnya xantonoida terpoliprenilasi dari *Garcinia gaudichaudii* bersifat sitotoksik terhadap beberapa jaringan sel kanker (Cao et al. 1998). Mangostin dari *Garcinia mangostana* ( $\alpha$ -,  $\beta$ - dan  $\gamma$ -mangostin) menghambat pertumbuhan sel kanker usus *DLD-1* (Akao et al. 2008), sel kanker leukemia *HL60* (Matsumoto et al. 2004), dan sel kanker mulut *KB* (Suksamrarn et al. 2006).

Penelitian ini dilakukan untuk mensintesis dua senyawa turunan sulokrin yaitu senyawa metil 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-karboksilat [A] dan asam 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1 karboksilat [B]. Sintesis dua senyawa turunan tersebut dilakukan melalui satu tahapan reaksi yaitu reaksi dengan basa KOH yang menyebabkan terjadinya dua reaksi sekaligus yaitu adisi konyugasi dari alkohol (siklisasi) dan reaksi hidrolisis substituen ester. Kedua senyawa tersebut diharapkan dapat dikembangkan untuk mendapatkan senyawa obat dengan rendemen (*yield*) yang cukup tinggi, mempunyai aktivitas dalam menghambat pertumbuhan sel kanker dan dihasilkan dari reaksi sederhana.

## 1.2 Tujuan Penelitian

1. Mensintesis senyawa turunan sulokrin, yaitu metil 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-karboksilat [A] dan asam 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-karboksilat [B].
2. Melakukan optimasi perolehan produk senyawa [A] dan [B] melalui perbandingan mol bahan baku awal sulokrin terhadap basa KOH dengan perbandingan berturut-turut 1:1; 1:2; 1:3; 1:4 dan 1:5 pada suhu yang tetap (100 °C).
3. Mengetahui aktivitas biologi dari senyawa [A] hasil sintesis terhadap sel kanker payudara *YMB-1*, sel kanker leukemia *HL60*, dan sel kanker kulit *KB* secara *in vitro*.

## 1.3 Manfaat Penelitian

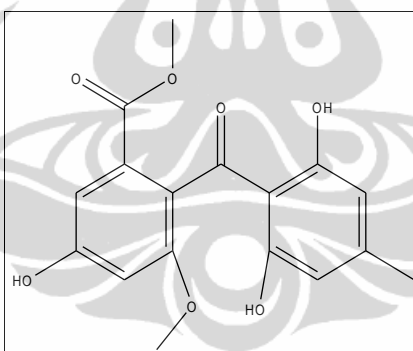
Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan kajian dan informasi ilmiah mengenai hasil sintesis senyawa turunan sulokrin (mengandung kerangka xanthon) yang kemungkinan mempunyai potensi sebagai obat antikanker seperti beberapa turunan xanthon yaitu,  $\alpha$ -mangostin,  $\beta$ -mangostin, dan  $\gamma$ -mangostin. Senyawa yang dihasilkan dari hasil sintesis ini adalah senyawa sederhana dan dapat dikembangkan sebagai calon obat antikanker yang bermanfaat untuk penyembuhan penyakit kanker.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Sulokrin

Sulokrin adalah metabolit yang diisolasi dari sejumlah jamur seperti *Aspergillus* dan *Penicillium sp.* Senyawa ini berperan sebagai inhibitor spesifik dari degranulasi eosinophil dan menghambat aktivasi chemotaxis (Ohashi et al. 1999). Prinsip penghambatan degranulasi eosinophil dapat digunakan sebagai obat anti-alergi seperti asma dan alergi peradangan pada kulit. Sulokrin dengan nama kimia metil 2-(2,6-dihidroksi-4-metil-benzoil)-5-hidroksi-3-metoksi-benzoat dengan rumus molekul  $C_{17}H_{16}O_7$  (Gambar 2.1) memiliki berat molekul 332,3 g/mol. Sulokrin merupakan padatan berwarna kuning muda yang larut dalam pelarut etanol, metanol, DMF dan DMSO (<http://www.bioaustralis.com>).

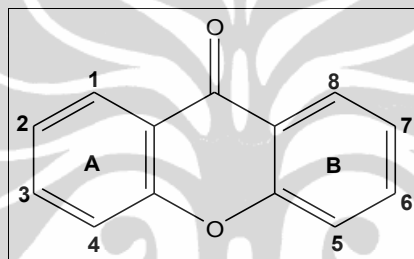


**Gambar 2.1. Struktur kimia senyawa sulokrin**

#### 2.2 Xanthon

Xanthon adalah merupakan hasil metabolit sekunder yang umumnya terdapat dalam familia tingkat tinggi, secara umum xanthon hanya terdapat dalam dua famili yaitu *Guttiferae* dan *Gentianaceae*. Tingkat taksonomi yang tinggi dalam suatu familia dan sifat farmakologinya cukup menarik perhatian. Inti xanthon secara alami simetrik dan berpasangan merupakan gabungan biogenetik,

dalam tumbuhan tinggi biasanya diperlukan untuk penomeran karbon menurut konvensi biosintetik. Karbon 1–4 diberikan untuk derivat asetat pada cincin A, dan karbon 5–8 diberikan pada derivat shikimat pada cincin B. Sistem penomeran berdasarkan pada xanthen-9-on seperti struktur pada Gambar 2.2 sebagai kerangka dasar. Klasifikasi xanthon secara garis besar dikelompokkan ke dalam lima kelompok utama yaitu: xanthon teroksigenasi sederhana (mono-oksigenasi xanthon, di-oksigenasi xanthon, tri-oksigenasi xanthon, tetra-oksigenasi xanthon), alkil-xanthon, glikosida xanthon, xanthon terprenilasi, toksilakxanthon, dan dipiranoxanthon (Graham & Lee, 1989; Peres & Nagem, 1997).



**Gambar 2.2. Kerangka dasar struktur senyawa xanthon**

Xanthon memiliki berbagai aktivitas biologi seperti sitotoksik, antimalaria, antioksidan, antibakteri, antiinflamasi, dan masih banyak aktivitas biologi lainnya. Beberapa contoh xanthon spesies *Garcinia* yang mengandung senyawa kimia yang memiliki aktivitas sitotoksik antara lain adalah:

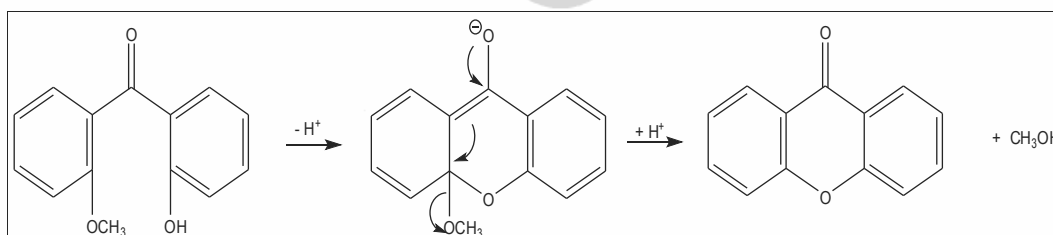
***G. bracteata***: dari ekstrak etil asetat daun, ditemukan enam xanthon terprenilasi. Hasil uji sitotoksik terhadap sel kanker *KB* menunjukkan aktivitas yang cukup potensial, yaitu: bractatin, 1-*O*-metilbractatin, isobractatin, 1-*O*-metil-isobractatin, 1-*O*-metil-8-metoksi,8,8a-dihidro bractatin, 1-*O*-metil-nebractatin dengan  $IC_{50}$  berturut-turut (0,4; 1,5; 0,3; 0,8; 1,5; 0,2)  $\mu\text{g/mL}$  (Odile et al. 2000)

***G. purpurea***: dari selaput buah *G. purpurea* ditemukan garcinol, isogarcinol dan xanthocymol yang aktif menghambat sel leukemia manusia *HL60* (Matsumoto et al. 2003).

***G. mangostana:***

- a. Dari ekstrak methanol buah telah ditemukan 6 jenis xanthon yang diuji terhadap 14 jenis sel kanker ternyata salah satu xanthon yaitu garcinon E memiliki potensi terhadap semua jenis sel kanker termasuk sel kanker saluran pernafasan dan kanker lambung (Chi-Kuan, Huang & Chen, 2002).
- b. Dari buah muda ditemukan tiga xanthon terpenilasi baru bersama 16 senyawa xanthon lama, salah satu senyawa baru yaitu mangostinon C aktif terhadap tiga sel kanker yaitu epidermoid carcinoma pada mulut (*KB*), kanker payudara (*BC-1*) dan kanker paru sel kecil (*NCI-H187*) dengan  $IC_{50}$  berturut-turut 2,8; 3,53; 3,72  $\mu\text{g/mL}$  dan  $\alpha$ -mangostin yang merupakan metabolit utama menunjukkan aktivitas terhadap *BC-1* dengan  $IC_{50}$  0,92  $\mu\text{g/mL}$  lebih aktif dari standar obat ellipticine ( $IC_{50}$  1,46  $\mu\text{g/mL}$ ).  $\alpha$ -mangostin juga menunjukkan aktivitas yang tinggi terhadap sel *KB*  $IC_{50}$  2,08  $\mu\text{g/mL}$  dan sel *DLD-1*, sedangkan gartanin sangat kuat aktif terhadap sel *NCI-H187* dengan  $IC_{50}$  1,08  $\mu\text{g/mL}$  (Suksamrarn et al. 2006; Akao et al.2008).

Hal menarik yang perlu diperhatikan adalah bahwa senyawa sulokrin yang diisolasi dari sumber alami dapat diubah ke dalam bentuk xanthon di bawah kondisi basa (Roberts, 1961; Hamasaki & Kimura, 1983). Mengikuti mekanisme yang disarankan berikut ini:



**Gambar 2.3. Mekanisme pembentukan xanthon dari sumber alami**

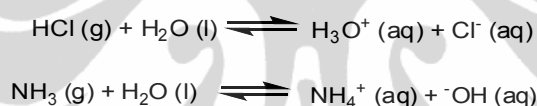


### 2.3 Teori Asam Basa

Konsep asam basa dibagi menjadi tiga (House, 2008; Fessenden & Fessenden, 1991), yang dijelaskan sebagai berikut:

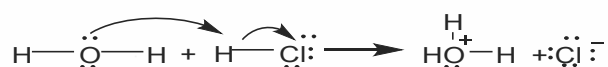
#### a. asam basa Arrhenius

Arrhenius mendefinisikan asam dan basa berdasarkan pengionannya dalam air. Asam adalah zat yang dalam pengionannya menghasilkan ion  $H^+$  atau  $H_3O^+$ , sementara itu basa ialah zat yang dalam air mengion menghasilkan ion  $OH^-$ . Senyawa yang termasuk golongan asam adalah:  $HCl$ ,  $HNO_3$ ,  $H_2SO_4$ ,  $H_3PO_4$  dan lain-lain. Senyawa yang termasuk golongan basa adalah  $NaOH$ ,  $KOH$ ,  $NH_3$ ,  $Ca(OH)_2$ , amina, dan lain sebagainya. Contoh dari reaksi asam basa Arrhenius diberikan dalam reaksi berikut ini:



#### b. asam basa Bronsted-Lowry

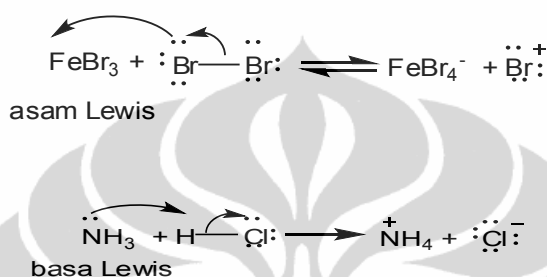
Menurut konsep ini, asam didefinisikan sebagai zat yang dapat memberikan proton (donor proton), sedangkan basa adalah zat yang dapat menerima proton (akseptor proton). Reaksi asam basa dalam konsep ini merupakan pemindahan proton dari asam ke basa, misalnya reaksi antara asam klorida dalam air berikut ini:



#### c. asam basa Lewis

Beberapa reaksi asam basa tidak mencakup perpindahan proton, dengan alasan ini dikembangkan konsep asam basa Lewis yang lebih umum mengenai asam basa. Asam Lewis adalah zat yang dapat menerima sepasang elektron, sehingga setiap spesies dengan atom yang kekurangan elektron dapat berfungsi

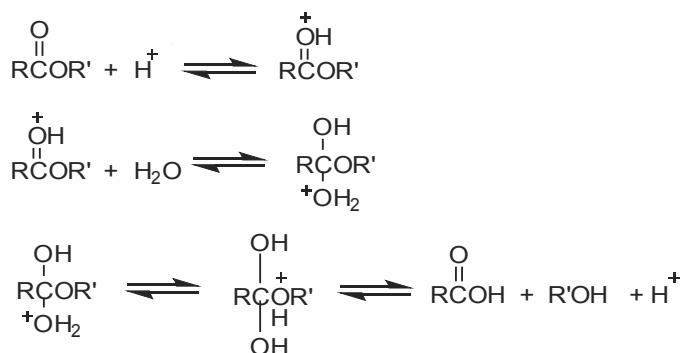
sebagai asam Lewis sebagai contohnya:  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_3$ , dan  $\text{AlBr}_3$ . Basa Lewis adalah zat yang dapat memberikan sepasang electron. Contoh dari basa Lewis adalah  $\text{NH}_3$  dan  $\text{OH}^-$ , masing-masing mempunyai sepasang elektron valensi yang menyendiri yang dapat disumbangkan ke  $\text{H}^+$ . Berikut ini merupakan reaksi asam basa Lewis.



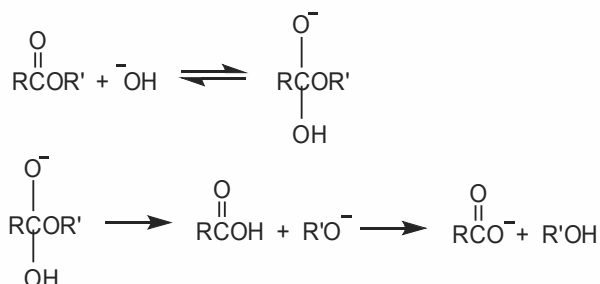
## 2.4 Reaksi Hidrolisis Ester

Ester dapat dihidrolisis baik dalam larutan asam atau larutan basa. Dalam larutan asam reaksi hidrolisis bersifat reversibel dan posisi kesetimbangan bergantung pada konsentrasi relatif air dan alkohol. Sementara itu dalam larutan basa/alkalis hidrolisis ester merupakan reaksi irreversibel (Carey & Sunberg, 2000). Reaksi hidrolisis dalam kondisi asam efektif pada pH 3–4 dan pada pH > 10 untuk kondisi hidrolisis dalam kondisi basa (Kirby, 1972; Trmcic & Hodgson, 2010). Reaksi hidrolisis ester secara umum diuraikan sebagai berikut.

a. hidrolisis ester yang dikatalisis oleh asam



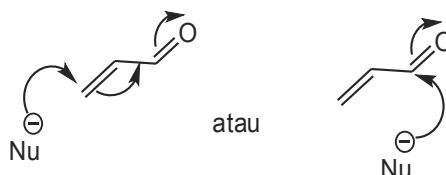
b. hidrolisis ester dikatalisis oleh basa



Sulokrin yang merupakan bahan baku awal dalam penelitian ini mengandung gugus ester yang dapat dengan mudah mengalami reaksi hidrolisis dengan adanya basa KOH. Basa KOH (dalam bentuk  $\text{}^{-}\text{OH}$ ) bertindak sebagai nukleofil yang dapat menyerang gugus karbonil dari ester sehingga membentuk keadaan tetrahedral intermediet seperti yang diuraikan pada mekanisme diatas. Tahap selanjutnya berlangsung lebih cepat adalah eliminasi  $\text{}^{-}\text{OR}$  yang merupakan gugus pergi yang baik ( $\text{pK}_{\text{aH}} = 16$ ) dan transfer proton sehingga produk akhir terbentuk anion karboksilat dan alkohol. Bukti mekanisme ini didukung oleh studi kinetik bahwa reaksi mengikuti kinetika orde kedua, yakni ester dan  $\text{}^{-}\text{OH}$  muncul dalam tahap penentu laju dan juga dengan penandaan isotop yang membuktikan bahwa ikatan asil-oksigen yang terputus selama reaksi hidrolisis bukan ikatan alkil oksigen (Carey & Sunberg, 2000).

## 2.5 Reaksi Adisi Konyugasi dan Adisi langsung

Senyawa yang mengandung gugus karbonil tak jenuh  $\alpha,\beta$ - dapat mengalami reaksi adisi konyugasi pada gugus  $\text{C}=\text{C}$  atau pun reaksi adisi langsung pada gugus  $\text{C}=\text{O}$ , seperti yang dituliskan berikut ini.



Demikian pula halnya dengan sulokrin yang dapat dengan mudah diserang oleh nukleofil karena mengandung beberapa gugus fenol yang bersifat asam, yang selanjutnya dengan adanya serangan intramolekular pada keton terkonyugasi memberikan produk siklik. Adapun kondisi adisi konyugasi atau konyugasi langsung secara umum seperti yang diuraikan dalam Tabel 2.1 berikut ini (Clayden et al. 2000).

**Tabel 2.1. Adisi konyugasi pada senyawa karbonil tak jenuh  $\alpha,\beta$ -**

	<b>Adisi konyugasi disukai (adisi-1,4 nukleofilik)</b>	<b>Adisi langsung pada C=O disukai (adisi 1,2)</b>
Kondisi reaksi (untuk adisi reversibel)	kontrol termodinamik: suhu tinggi, reaksi dengan waktu lama	kontrol kinetik: suhu rendah, reaksi dengan waktu singkat
Struktur senyawa tak jenuh $\alpha,\beta$ -	gugus C=O yang tidak reaktif (amida, ester) karbon $\beta$ - tak terintangi	gugus C=O reaktif (aldehida, asil klorida) karbon $\beta$ - terintangi
Jenis nukleofil	nukleofil kuat	nukleofil lembut
Organologam	organotembaga atau katalitik Cu(I)	organolitium, reagensia Grignard

## 2.6 Kanker

Kanker adalah penyakit yang diawali dengan terjadinya pembelahan sel yang tidak terkendali dan kemampuan dari sel-sel tersebut menyebar dan menyerang jaringan biologis tubuh lainnya, baik secara *invasi* (jaringan yang bersebelahan) maupun *metastatis* (migrasi sel ke jaringan yang jauh). Pembelahan sel yang tidak terkendali tersebut diakibatkan oleh kerusakan DNA, ataupun terjadinya perubahan DNA, yang menyebabkan terjadinya mutasi pada gen vital termasuk pada gen yang mengontrol proses pembelahan sel. Terjadinya proses mutasi dapat diakibatkan oleh berbagai faktor (karsinogen) seperti kebiasaan merokok, kekurangan konsumsi sayuran dan buah-buahan, konsumsi alkohol, polusi, dll (WHO, 1995). Mutasi dapat terjadi secara spontan (faktor luar) ataupun faktor keturunan (mutasi *germline*) (<http://en.wikipedia.org/wiki/cancer>).

Pertumbuhan sel yang tidak normal pada suatu jaringan sebagai akibat adanya kekeliruan urutan DNA karena terpotong, tersubstitusi, perubahan ekspresi gen, adisi bahan kimia ataupun virus. Adapun tumor yang bersifat membahayakan dikenal sebagai kanker, pemicu terjadinya kanker disebut karsinogen, sementara proses perkembangan sel kanker dikenal dengan istilah karsinogenesis. Berbagai jenis senyawa kimia yang bersifat karsinogen antara lain adalah hidrokarbon polisiklik aromatik (benzo ( $\alpha$ ) piren, naftalena, antrasena, krisin), amino aromatik (2-naftilamina, aflatoksin, dialkilnitrosamin, safrol, alkaloid pirolizidin), nitrosamin & nitrosamida, radiasi senyawa radioaktif, sinar ultra-violet, atau sinar-x (Wolff, 1994; Siswandono & Soekarjo, 1995). Hidrokarbon polisiklik aromatik bekerja sebagai karsinogen melalui suatu tahapan ikatan kovalen dengan sel makro DNA, RNA dan protein (Wolff, 1994).

Berbeda dengan sel normal, sel kanker tidak mengalami proses apoptosis (kematian sel), tidak mempunyai fungsi penunjang aktivitas tubuh (sel normal memiliki kemampuan berkoordinasi dengan sel lain sebagaimana fungsinya dalam tubuh), mempunyai kemampuan untuk hidup dan tumbuh pada jaringan sel lain, dan mempunyai kemampuan memperbanyak diri (proliferasi) yang tidak terkendali.

Karsinogenesis dapat dibagi menjadi dua tahap, yaitu *inisiasi*: karsinogen mulai bekerja dengan mengubah atau mengikat DNA sehingga urutannya berubah dan mengakibatkan terjadinya mutasi sel. Proses mutasi yang banyak dan terjadi pada berbagai jenis DNA lah yang akhirnya menyebabkan terjadinya perubahan sifat sel yang berbeda dari sifat sel normal sebelumnya. Sel abnormal tersebut akan memperbanyak diri (proliferasi) pada jaringan tubuh tertentu dan membentuk kelompok sel abnormal yang dikenal sebagai tahapan promosi kanker. Tahap kedua karsinogenesis adalah proses *proliferasi*: pembelahan sel kanker yang tak terkendali. Sel abnormal hasil pembelahan dapat memisahkan diri dan berpindah ke jaringan lain (metastatis) untuk kemudian kembali membelah dan memperbanyak diri (proliferasi). Dalam upaya memenuhi kebutuhannya untuk bertahan hidup dan membelah, sel kanker akan membentuk pembuluh darah

(neoangiogenesis) (<http://www.nano.lipi.go.id>)

Ada beberapa cara untuk menangani kanker tergantung pada keadaan/stadium kanker itu sendiri. Beberapa penanganan tepat menjadi suatu alternatif untuk menghambat pertumbuhan kanker berubah menjadi ganas di antaranya adalah operasi transplantasi sum-sum tulang, radioterapi, atau kemoterapi dengan pemberian obat yang bersifat sitotoksik (<http://en.wikipedia.org/wiki/cancer>).

## 2.7 Uji Bioaktivitas

### 2.7.1 *Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)*

*Brine shrimp lethality test* (BSLT) merupakan uji toksisitas pendahuluan yang paling banyak digunakan terhadap suatu senyawa bioaktif. Keuntungan metode BSLT ini karena murah, mudah diperoleh, dapat bertahan hidup beberapa tahun dalam keadaan kering, mudah dan cepat dalam pelaksanaannya, serta hanya menggunakan peralatan yang cukup sederhana.

*A. salina* Leach., adalah hewan air yang termasuk dalam filum Anthropoda, kelas *Crustaceae* yang hidup di daerah subtropik dengan salinitas tinggi. Larva *A. salina* diperoleh dengan cara menetasakan telurnya dalam air laut atau air laut buatan selama 48 jam (Meyer et al. 1992) dengan suhu penetasan antara 20–35 °C. Pada uji toksisitas digunakan larva *A. salina* berumur 24 jam sebanyak 10–15 ekor yang dimasukkan ke dalam vial berisi sampel dengan beberapa konsentrasi berbeda, dan dibiarkan pada tempat dengan udara dan sinar yang cukup. Persentase kematian larva *A. salina* dihitung setelah 24 jam pemberian terhitung sejak larva dimasukkan ke dalam vial berisi sampel uji, untuk kemudian dihitung nilai  $LC_{50}$ -nya (konsentrasi senyawa uji dalam ppm yang dapat menyebabkan kematian sebanyak 50% larva *A. salina* di bawah kondisi yang telah ditetapkan/sesuai).

### 2.7.2 Uji Sitotoksitas

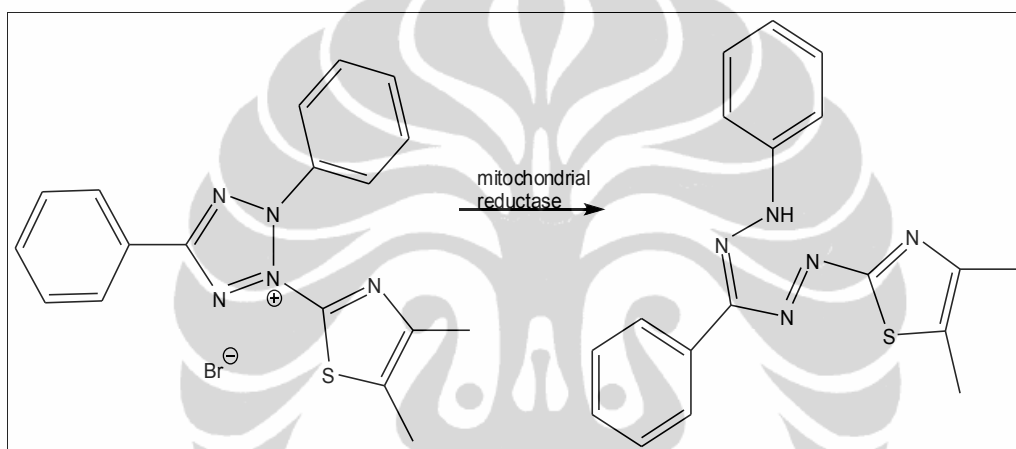
Uji sitotoksitas merupakan salah satu contoh uji yang digunakan untuk mengevaluasi daya sitotoksik suatu senyawa yang akan digunakan sebagai bahan obat menggunakan kultur sel secara *in vitro*. Salah satu syarat uji sitotoksitas adalah sistem uji tersebut harus menghasilkan kurva dosis respon yang reproduksibel 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 (Budi, 2006).

Pengembangan metode *in vitro* sebagai alternatif pengganti pengujian hewan uji mempunyai tujuan untuk mendeteksi potensi ketoksikan suatu obat pada manusia (Klassen, 2001; Rahmawati, 2004). Meskipun hasil uji secara *in vitro* tidak berkorelasi secara langsung dengan aktivitas *in vivo*, namun dapat menggambarkan efek senyawa uji yang sama bila diberikan secara *in vivo* dan dapat memberi informasi potensi efek obat pada sel target manusia (Rahman, Choudhary & Thomsen, 2001).

Uji sitotoksitas secara *in vitro* menggunakan sel primer maupun sub kultur sel yang merupakan turunan dari satu atau lebih generasi sel primer tunggal yang sering disebut *cell line* (Rahmawati, 2004; Cammack et al. 2006). Dalam satu populasinya *cell line* memiliki karakteristik sama, digunakan dalam satu periode waktu tertentu, dan dalam uji sitotoksitas bisa berasal dari sel kanker manusia maupun hewan. Sel kanker hewan yang digunakan untuk uji sitotoksitas harus memiliki kesamaan sifat dan karakteristik dengan sel kanker manusia (Harborne & Dey, 1991).

Metode yang digunakan dalam uji sitotoksitas salah satunya adalah metode MTT. Metode ini didasarkan atas pengukuran intensitas warna secara kolorimetri. Intensitas warna sebagai hasil metabolisme suatu substrat MTT 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 enzim dehidrogenase yang terdapat di dalam mitokondria aktif menjadi formazan

yang merupakan zat warna ungu. Kemampuan suatu sel untuk mereduksi MTT memberikan indikasi aktivitas pada mitokondria dari suatu sel yang dapat diinterpretasi sebagai suatu ukuran dari jumlah sel/proliferasi sel/*viability* sel /toksisitas sel. Absorbans dari warna yang terbentuk dikuantifikasi pada panjang gelombang tertentu dengan kisaran  $\lambda = 500\text{--}600$  nm dengan spektrofotometer UV/VIS (Wikipedia, 2010; Maioli et al. 2009; Sadeghi-aliabadi et al. 2008 Rahman et al, 2004; Fotakis & Timrel, 2006), seperti terlihat dalam berikut ini :



**Gambar 2.4. Reaksi reduksi MTT menjadi formazan.**

Bukti yang terbaru menyatakan bahwa reduksi MTT dapat juga dimediasi oleh NADH atau NADPH yang terdapat di dalam dan di luar mitokondria (Fotakis & Timrel, 2006; Berridge et al. 1996). Metode lain yang biasa digunakan dalam uji sitotoksisitas adalah penghitungan jumlah sel langsung di bawah mikroskop dengan bantuan haemositometer dan metode pewarnaan menggunakan tripan biru (Budi, 2006).



## BAB 3

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Bahan Alam Pangan dan Farmasi Pusat Penelitian Kimia Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) PUSPIPTEK (Pusat Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi) Serpong pada bulan Maret hingga Oktober 2010.

#### 3.2 Bahan dan Alat

##### 3.2.1 Bahan

Bahan-bahan yang dipergunakan adalah:

- (a) Bahan baku: sulokrin (metil 2-(2,6-dihidroksi-4-metilbenzoil)-5-hidroksi-3-metoksi benzoat), kalium hidroksida (KOH).
- (b) Pelarut: aseton, etil asetat, metanol, diklorometana, kloroform, larutan HCl 5%, akuades.
- (c) Zat Pengering: natrium sulfat anhidrat.
- (d) Pemurnian/ Identifikasi: kromatografi lapis tipis (KLT) Silica Gel 60 F 254 (Merck), asam sulfat *pa* 10 % dalam metanol atau etanol, kromatografi kolom gravitasi Silica gel 60 ukuran partikel 230–400 mesh, DMSO- $d_6$ , KBr,  $CD_3OD$ .

##### 3.2.2 Peralatan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas yang ada di laboratorium kimia seperti: labu, gelas piala, tabung reaksi, gelas ukur, corong pisah, dan batang pengaduk, seperangkat alat refluks, alat destilasi, bejana KLT, kolom kromatografi, timbangan analitik, pengaduk magnet dan *hot plate stirrer*, termometer, evaporator vakum, oven, mikropipet, lampu UV dengan panjang gelombang 254 dan 365 nm, spektrofotometer FT-IR Shimadzu 2010A,

spektrofotometer UV U-200 Hitachi, spektrometer *Nuclear Magnetic Resonance* proton dan karbon ( $^1\text{H}$  NMR dan  $^{13}\text{C}$  NMR) JEOL ECA NMR 500 MHz, LC-MS Asquire3000plus-01073 Shimadzu.

### 3.3 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui empat tahap pekerjaan yang terdiri dari:

- (1) Sintesis, identifikasi, dan karakterisasi senyawa turunan sulokrin
- (2) Optimasi sintesis senyawa [A] dan [B] dengan perbandingan mol bahan baku awal sulokrin terhadap basa KOH dengan perbandingan berturut-turut 1:1; 1:2; 1:3; 1:4 dan 1:5
- (3) Uji toksisitas dengan larva udang (*A. salina* Leach)
- (4) Uji sitotoksitas senyawa turunan sulokrin dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara *YMB-1*, sel kanker leukemia *HL60*, dan sel kanker kulit *KB* secara *in vitro*.

#### 3.3.1 Sintesis, identifikasi, dan karakterisasi senyawa turunan sulokrin

##### 3.3.1.1 Sintesis senyawa turunan sulokrin (reaksi adisi konyugasi dari alkohol dan hidrolisis substituen ester)

Sintesis senyawa turunan sulokrin yakni, metil 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-karboksilat [A] dan asam 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-karboksilat [B] dilakukan dengan mereaksikan antara 50,0 mg sulokrin (0,15 mmol) dalam 5 mL aseton dan 8,4 mg KOH (0,15 mmol) dalam akuades 5 mL pada labu bulat berleher dua yang dihubungkan dengan kondensor untuk kemudian direaksikan pada suhu 100 °C selama 24 jam sambil diaduk dengan magnetik stirer. Proses reaksi dihentikan setelah dilakukan identifikasi menggunakan KLT untuk mengetahui bahwa bahan baku awal sudah bereaksi menjadi produk yang diharapkan. Fase gerak yang digunakan dalam KLT adalah kloroform: metanol (95:5) dan diamati di bawah lampu ultra-violet pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 254 dan 365 nm serta penampak bercak asam sulfat 10 % dalam

etanol dan dipanaskan. Reaksi dianggap berhasil bila telah terbentuk noda berwarna kuning muda pada  $\lambda$  254 nm, bercak ini akan jelas terlihat berwarna kekuningan setelah disemprot dengan asam sulfat, serta tidak tampak noda sulokrin yang berarti telah habis bereaksi. Selanjutnya hasil reaksi ditambahkan larutan asam klorida (5 %) sampai pH sekitar 2–3, untuk menetralkan kelebihan basa. Identifikasi dengan KLT kembali dilakukan seperti pada tahap reaksi sebelumnya untuk memastikan produk karboksilat dari hidrolisis ester sudah terbentuk. Hasil netralisasi kemudian diekstrak dengan etil asetat dan ditambahkan akuades yang selanjutnya dipartisi dalam corong pisah. Fase organik etil asetat ditambahkan natrium sulfat anhidrat hingga jenuh untuk menjerap air. Filtrat etil asetat kemudian diuapkan dengan rotari evaporator untuk selanjutnya dimurnikan. Pemurnian senyawa [A] dan [B] dilakukan dengan kromatografi kolom dengan fase diam silika gel dengan fase gerak sistem gradien mulai dari diklorometana, diklorometana:metanol (95:5), diklorometana:metanol (90:10), dan seterusnya. Setiap fraksi ditampung pada tabung reaksi dengan volume kira-kira 5 mL untuk kemudian dilakukan analisis dengan KLT sampai diperoleh fraksi yang memberikan pola noda tunggal berwarna kuning [A] dan kuning muda [B]. Fraksi yang memiliki noda tunggal masing-masing berwarna kuning dan kuning muda setelah disemprot asam sulfat tersebut kemudian digabungkan untuk selanjutnya dievaporasi. Hasil evaporasi kemudian diidentifikasi lebih lanjut untuk memastikan apakah senyawa tersebut merupakan senyawa [A] dan senyawa [B] dengan menggunakan spektrofotometer UV, LC-MS, FTIR dan spektrometer NMR ( $^1\text{H}$ - dan  $^{13}\text{C}$ -NMR).

Pada penelitian ini juga dilakukan optimasi perolehan produk senyawa [A] dan [B] dengan variasi bahan baku awal sulokrin terhadap basa KOH masing-masing perbandingannya berturut-turut 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; dan 1:5 yang diatur pada suhu yang tetap yaitu 100 °C.

### 3.3.1.2 Identifikasi dan karakterisasi senyawa

#### A. KLT (Kromatografi Lapis Tipis)

Sejumlah sampel diambil menggunakan pipa kapiler lalu ditotolkan ke atas plat KLT yang sebelumnya telah ditetapkan letak sampel yang akan dilarikan oleh fase gerak KLT yaitu Rf 0,5 cm dari batas bawah dan Rf 0,2 cm dari batas atas. Produk yang telah ditotol disertakan bersama pereaksi sebagai pembandingnya. Plat diletakkan dalam bejana kecil yang berisi pelarut yang tingginya di bawah tempat penotolan pada plat KLT dan bejana ditutup kemudian pelarut dibiarkan merambat naik sampai batas atas yang telah ditentukan. Proses pengembangan sampel oleh eluen fasa gerak menggunakan pelarut kloroform: metanol = 95:5 dan 80:20.

Hasil analisis KLT diamati menggunakan lampu UV pada panjang gelombang,  $\lambda = 254$  dan  $365$  nm selanjutnya disemprot dengan larutan asam sulfat untuk menampakkan bercak.

#### B. Spektrofotometer UV (*Ultra Violet*)

Sampel dilarutkan dalam metanol hingga memberikan konsentrasi 1000 ppm kemudian dianalisis serapannya pada daerah UV dengan kisaran panjang gelombang  $\lambda = 200$ – $400$  nm.

#### C. Spektrofotometer FT-IR (*Fourier Transform Infra Red*)

Sampel berupa padatan digerus bersama KBr lalu ditekan menjadi cakram tipis. Sampel padat tersebut diukur serapannya pada daerah infra merah panjang gelombang,  $\lambda = 15,4$ – $2,5$   $\mu\text{m}$  ( $650$ – $4000$   $\text{cm}^{-1}$ ) menggunakan spektrofotometer FT-IR.

#### **D. Spektrofotometer LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*)**

Sampel dilarutkan dalam metanol hingga memberikan konsentrasi 1000 ppm kemudian sampel sebanyak 10 µL diinjek ke dalam kolom HPLC dengan laju alir 1 mL/menit dan fase netral dari sampel diubah ke bentuk gas yang menghasilkan ion-ion dengan sistem ESI (*Electrospray Ionization*). Ion-ion yang terpisah kemudian dideteksi dengan spektrometer massa.

#### **E. Spektrometer NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*)**

Sampel dilarutkan dalam pelarut DMSO ( $d_6$ ) yang mengandung TMS (tetra metilsilan). Sampel dimasukkan ke dalam tabung NMR sampai tinggi larutan berada 4 cm dari tinggi tabung 20 cm. Tabung dimasukkan ke dalam alat NMR untuk analisis  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, HMBC, dan HMQC.

### **3.3.2 Uji toksisitas dengan larva udang (*A.salina* Leach)**

#### **3.3.2.1 Penetasan larva udang**

Kurang lebih 50–100 mg telur udang ditetaskan di dalam tempat persegi panjang (2 x 10 cm) yang dilengkapi pembatas berlubang diameter 2 mm dan telah diisi air laut, ditutup dengan kertas aluminium pada bagian telur, dan dibiarkan 48 jam, maka telur akan menetas dan larva-larva udang yang akan diuji diambil dengan pipet dari sisi yang terang.

#### **3.3.2.2 Persiapan larutan yang akan diuji**

Senyawa murni yang akan diuji dibuat dengan konsentrasi 2000, 1000, 200, 20 ppm dalam air laut. Bila senyawa tidak larut, ditambahkan 10 µL DMSO.

#### **3.3.2.3 Uji toksisitas metode Meyer**

Larva udang yang hidup sebanyak 10-11 ekor dimasukkan ke dalam vial uji yang berisi 100 µL air laut. Ditambahkan larutan sampel yang akan diuji masing-masing sebanyak 100 µL, sehingga konsentrasi akhir 10, 100, 500, 1000

ppm. Larutan diaduk sampai homogen, untuk setiap konsentrasi dilakukan 3 kali pengulangan. Kontrol dilakukan tanpa penambahan sampel, kemudian didiamkan selama 24 jam. Dihitung jumlah larva yang mati dan yang masih hidup. Selanjutnya tingkat mortalitas dihitung dengan membandingkan antara jumlah larva yang mati dibagi dengan jumlah total larva.

Dengan membuat grafik antara log konsentrasi terhadap mortalitas diperoleh persamaan regresi linier dengan  $y = ax + b$ . Nilai  $LC_{50}$  diperoleh dengan memasukkan nilai  $y = 50$ , maka diperoleh konsentrasi senyawa uji yang menyebabkan kematian 50% larva yang disebut  $LC_{50}$ . Suatu zat dikatakan aktif jika mempunyai nilai  $LC_{50} \leq 50$  ppm (Meyer et al. 1992).

### **3.3.3. Uji sitotoksitas sel kanker payudara *YMB-1*, sel kanker leukemia *HL60*, dan sel kanker kulit *KB* secara *in vitro***

Kultur sel kanker masing-masing sejumlah  $3 \times 10^3$  sel/mL pada fase logaritma, disuspensikan ke dalam media RPMI 1640 yang telah diberi suplemen serum fetal bovine (FBS), penisilin dan streptomisin. Hari pertama sel diinokulasikan ke dalam plat mikro 96 sumuran (*well plate*) kemudian diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 24 jam dalam inkubator  $\text{CO}_2$ . Hari kedua dilakukan penambahan sampel yang dilarutkan dalam pelarut DMSO. Pengenceran sampel dilakukan dengan menambahkan PBS (*phosphoric buffer saline*) dengan pH (7,30–7,65). Sampel dengan konsentrasi beragam (0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; dan 100  $\mu\text{g/mL}$ ) ditambahkan ke dalam sel dalam plat mikro lalu dikocok dengan *microplate mixer* dan disimpan kembali dalam inkubator  $\text{CO}_2$ . Sebagai kontrol negatif digunakan DMSO dan kontrol positif digunakan Antimisin  $\text{A}_3$ .

Proses inkubasi sel dilanjutkan kembali selama 48 jam, kemudian ditambahkan reagen 3-(4,5-dimetil thiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromide (MTT) dan dikocok menggunakan *microplate mixer*. Inkubasi dilanjutkan kembali

selama 4 jam, kemudian ditambahkan *stop solution* dari pelarut deterjen SDS (sodium dodesil sulfat) untuk melarutkan produk formazan yang terbentuk dan campuran dikocok dengan baik tanpa meninggalkan busa yang dapat mengganggu dalam pengamatan. Inkubasi sel dilanjutkan kembali selama 24 jam. Perubahan warna dari MTT kuning menjadi formazan ungu dikuantifikasi pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) = 570 nm dengan spektrofotometer UV/VIS. Absorbansi (A) larutan diukur dengan *microplate reader* setelah penambahan *stop solution*. Uji aktivitas antikanker ini dilakukan dengan tiga kali ulangan.

Ketika jumlah formazan (ungu) yang dihasilkan oleh sel yang diperlakukan (*treated cell*) dengan satu zat uji dibandingkan dengan jumlah dari formazan yang dihasilkan oleh sel (kontrol) yang tidak mengalami perlakuan, maka efektivitas/kemampuan dari zat uji dalam menyebabkan kematian dari sel dapat ditentukan, yaitu melalui hubungan jumlah formazan yang dihasilkan dari suatu kurva hubungan dosis (konsentrasi) dengan respon/intensitas warna/ absorbansi (Sadeghi-aliabadi et al. 2008; Wikipedia, 2010).

Perhitungan persentase sel yang hidup dihitung dengan persamaan berikut, dengan persentase sel yang hidup dalam kontrol negatif diasumsikan 100.

$$\% \text{ sel yang hidup} = \frac{A_t - A_b}{A_c - A_b} \times 100$$

Dengan,  $A_t$ : absorbansi dari berbagai konsentrasi senyawa uji

$A_b$ : absorbansi dari blanko (tanpa penambahan senyawa uji)

$A_c$ : absorbansi dari kontrol negatif

Nilai % inhibisi sel = 100 – % sel yang hidup

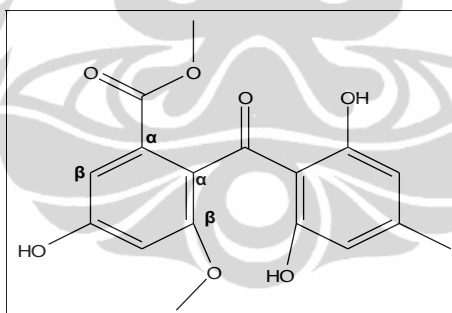
Penentuan nilai  $IC_{50}$  dilakukan dengan membuat kurva regresi linier hubungan konsentrasi senyawa uji terhadap % inhibisi sel. Nilai  $IC_{50}$  diperoleh dengan memasukkan nilai  $y = 50$ , maka diperoleh konsentrasi senyawa uji yang menyebabkan kematian 50 % sel yang disebut  $LC_{50}$ .

## BAB 4

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Sintesis Senyawa Turunan Sulokrin

Sintesis senyawa turunan sulokrin yaitu, metil 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-karboksilat [A] dan asam 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-karboksilat [B] dilakukan melalui satu tahapan reaksi. Namun, dalam reaksi ini terjadi dua reaksi sekaligus yakni adisi konyugasi dari alkohol yang dikatalisis oleh KOH yang menghasilkan produk [A] dan reaksi hidrolisis substituen ester pada produk [A] yang sudah membentuk siklik menjadi produk [B] yang mengandung substituen karboksilat. Secara bentuk, struktur sulokrin mengandung senyawa karbonil tak jenuh  $\alpha$ ,  $\beta$ - bila ditinjau dari dua sisi yakni, dari gugus keton (jembatan dua gugus aromatik) terhadap gugus hidroksi/fenol aromatik dan dari gugus karbonil ester terhadap aromatik seperti ditunjukkan pada Gambar 4.1.



**Gambar 4.1.** Struktur sulokrin sebagai senyawa karbonil tak jenuh  $\alpha$ ,  $\beta$ -

Bentuk ini memungkinkan terjadinya reaksi adisi konyugasi terhadap C=C (adisi-1,4 nukleofilik) dan reaksi adisi langsung terhadap gugus karbonil ester (adisi 1,2). Kemungkinan serangan kompetitif dari nukleofil kemudian dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu: kondisi reaksi, natur dari senyawa karbonil tak jenuh  $\alpha$ ,  $\beta$ -, dan tipe nukleofil (Clayden et al. 2000).



Kondisi reaksi yang dilakukan pada penelitian ini adalah pengolahan sulokrin dengan basa KOH pada suhu yang tinggi (100 °C) disertai pengadukan yang kontinyu yang dilangsungkan selama 24 jam. Oleh karena itu reaksi berada di bawah kontrol termodinamik yang meliputi suhu yang tinggi dan waktu reaksi yang lebih lama/panjang yang menjamin bahwa bahkan reaksi yang lebih lambat mempunyai kesempatan untuk terjadi/terbentuk, dan semua sulokrin yang merupakan bahan baku awal dapat dikonversi menjadi produk senyawa yang lebih stabil. Dalam hal ini terjadi reaksi adisi konyugasi yang diawali dengan serangan nukleofil terhadap gugus fenol membentuk anion fenoksida, anion fenoksida inilah yang kemudian menyerang secara intramolekular terhadap karbon  $\beta$ - yang terkonyugasi dengan karbonil keton sehingga terjadi pembentukan siklik. Namun, tidak menutup kemungkinan reaksi adisi langsung pada gugus karbonil ester juga terjadi karena gugus karbonil ini mengemban muatan positif yang lebih besar dibandingkan dengan atom karbon  $\beta$ - yang terkonyugasi pada gugus karbonil keton. Sehingga daya tarik/atraksi elektrostatik nukleofil yang bermuatan negatif mendorong serangan adisi secara langsung terhadap gugus karbonil ester dibandingkan terhadap karbon  $\beta$ - yang terkonyugasi pada gugus karbonil keton. Dalam hal ini terjadi reaksi hidrolisis ester lewat tahapan adisi OH yang lambat dan diikuti dengan tahapan cepat eliminasi gugus  $^-OCH_3$  dan transfer proton (Clayden et al. 2000).

Senyawa [A] dan [B] ini merupakan senyawa target sintesis dalam penelitian ini yang kemudian dioptimasi perolehan rendemennya dengan variasi perbandingan mol bahan baku awal (sulokrin) terhadap basa KOH. Senyawa turunan sulokrin ([A] dan [B]) yang diperoleh ini di analisis menggunakan spektrofotometer UV untuk mengetahui ada tidaknya gugus kromofor dalam senyawa, spektrofotometer FT-IR untuk mengetahui gugus fungsi, spektrofotometer kromatografi cair-massa (LC-MS) untuk mengetahui bobot molekul senyawa, dan spektrometer *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) untuk penentuan struktur molekul berdasarkan pergeseran kimia ( $\delta$ ).

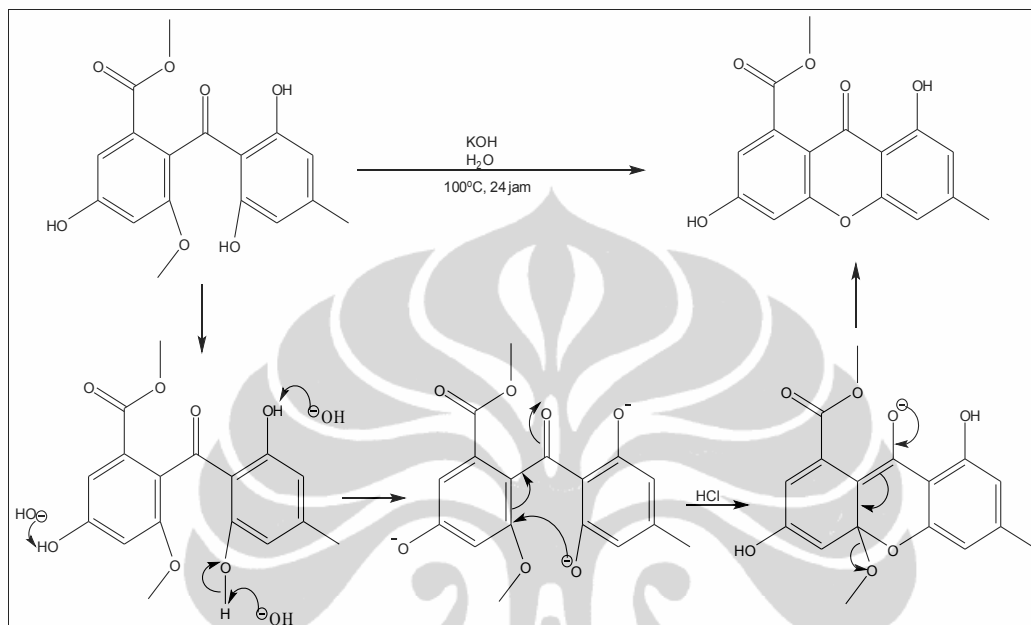
Setelah senyawa target sintesis terbentuk kemudian dilakukan uji toksisitas dengan metode *brine shrimp lethality test* (BSLT) sebagai uji bioaktivitas awal yang merupakan dasar sebelum dilakukan uji aktivitas *in vitro* sebagai inhibitor terhadap pertumbuhan sel kanker sel kanker payudara *YMB-1*, sel kanker leukemia *HL60*, dan sel kanker kulit *KB* dengan metode MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida). Uji aktivitas ini berfungsi untuk mengetahui nilai  $IC_{50}$  senyawa hasil sintesis yaitu senyawa [A].

#### 4.1.1 Sintesis Senyawa metil 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-karboksilat [A]

Sintesis senyawa [A] pada penelitian ini telah dilakukan pada beberapa perbandingan konsentrasi bahan baku awal (sulokrin) terhadap basa (KOH) untuk memperoleh kondisi optimum yang menghasilkan rendemen yang lebih tinggi dengan pengaturan suhu yang tetap (100 °C). Pemilihan katalis KOH didasarkan pada kemampuannya sebagai basa kuat yang dapat terionisasi sempurna dalam air menghasilkan ion  $OH^-$  sehingga dapat bertindak sebagai nukleofil yang cukup kuat yang mampu untuk mendeptonasi berbagai jenis asam bahkan asam yang bersifat lemah sekalipun seperti golongan fenol (Wikipedia, 2010). Reaksi sintesis senyawa [A] mengikuti mekanisme reaksi yang tertera pada Gambar 4.2 berikut.

Fenol merupakan asam yang lemah ( $pK_a$  10), namun lebih asam bila dibandingkan dengan alkohol karena anion yang dihasilkannya distabilkan oleh resonansi, dengan muatan negatifnya didelokalisasi oleh cincin aromatik. Fenol dengan mudah dideptonasi oleh  $OH^-$  sehingga menghasilkan anion fenoksida yang bersifat lebih nukleofilik dibandingkan dengan ion hidrokksida. Anion fenoksida kemudian menyerang secara intramolekular terhadap keton terkonyugasi memberikan produk siklik dalam jumlah yang tinggi, disertai dengan eliminasi metanol yang berasal dari pelepasan ion metoksida. Dalam hal ini, metoksida ( $pK_{aH} \approx 16$ ) juga dapat mendeptonasi fenol dengan sempurna, dengan

serangan kompetitif oleh  $\text{MeO}^-$  yang bertindak sebagai nukleofil. Namun, hal itu tidak menjadi masalah karena reaksi intramolekular biasanya lebih cepat dibandingkan dengan reaksi intermolekular yang ekuivalen (Clayden et al. 2000).



**Gambar 4.2. Mekanisme reaksi sintesis senyawa metil 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-karboksilat [A]**

Reaksi seperti ini juga biasanya umum terjadi pada pembentukan senyawa turunan xanthon yang berasal dari sumber alami dengan mengkondisikannya dengan larutan yang sedikit basa (Roberts, 1961; Hamasaki & Kimura, 1982).

Untuk mendeteksi pembentukan produk reaksi siklisasi senyawa [A] dan dilakukan identifikasi awal secara kualitatif dengan KLT (Lampiran 1) menggunakan fase diam silika gel dan eluen kloroform dan metanol (95:5) sebagai fase gerak. Pertimbangan penggunaan komposisi eluen tersebut dikarenakan senyawa produk hasil sintesis cenderung bersifat semipolar sehingga akan terelusi dengan baik menggunakan campuran kloroform dan metanol dengan komposisi sifat semipolar lebih besar daripada sifat semipolarnya. Ada tiga spot yang teramati dari hasil sintesis di bawah lampu UV pada panjang gelombang,  $\lambda =$

254 dan 365 nm. Spot yang terbentuk untuk produk dibandingkan dengan spot yang ada pada bahan baku sulokrin memberikan nilai  $R_f$  sebagai berikut:  $R_{f1} = 0$  adalah spot yang serupa dengan produk siklik karboksilat [B],  $R_{f2} = 0,2$  sebagai produk yang serupa dengan bahan baku awal yaitu sulokrin,  $R_{f3} = 0,5$  sebagai produk siklik ester [A]. Spot pada  $R_{f3}$  yang diduga senyawa turunan xanthon ini memberikan warna kuning muda disinari oleh sinar UV pada  $\lambda = 254$  dan 365 nm dan memberikan warna kuning terang setelah disemprot dengan penampak bercak asam sulfat (Robert, 1961). Sementara itu spot  $R_{f0}$  tidak berwarna pada  $\lambda = 254$  dan 365 nm dan berwarna kuning tua setelah disemprot dengan penampak bercak.

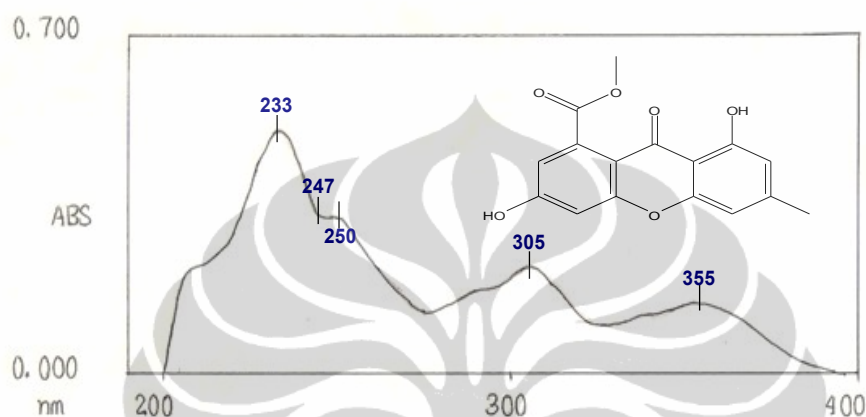
Untuk mendapatkan produk senyawa [A] teknik pemurnian dengan kolom kromatografi, produk senyawa [A] ini diperkirakan adalah metil 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-karboksilat. Sintesis reaksi siklisasi menghasilkan rendemen yang lebih tinggi (65,56%) dengan penggunaan basa KOH yang perbandingan mmol-nya ekuivalen dengan sulokrin yakni perbandingan 1:1, sementara itu rendemen senyawa [A] cenderung semakin menurun dengan bertambahnya konsentrasi basa KOH (53,33 % pada perbandingan 1:5). Rendemen dihitung dari perbandingan mol sulokrin terhadap basa KOH (Lampiran 2).

Spektrum UV dapat digunakan dalam penetapan struktur suatu senyawa organik. Absorpsi cahaya UV mengakibatkan transisi elektronik yaitu promosi elektron dari orbital keadaan dasar dan berenergi rendah ke orbital keadaan tereksitasi berenergi lebih tinggi. Elektron yang bertanggung jawab dalam mengabsorpsi cahaya adalah (1) elektron yang terlibat langsung dalam pembentukan ikatan antar atom-atom, (2) elektron bebas atau tak berpasangan (Hendayana et.al. 1994). Panjang gelombang cahaya UV bergantung pada promosi elektron. Molekul-molekul yang memerlukan energi lebih banyak akan melakukan promosi elektron dan menyerap pada panjang gelombang lebih pendek sebaliknya molekul-molekul yang memerlukan energi lebih sedikit akan

menyerap pada panjang gelombang lebih panjang. Senyawa yang menyerap cahaya dalam daerah spektrum panjang gelombang pada  $\lambda = 200\text{--}700$  nm umumnya mengakibatkan transisi elektron gugus fungsional tak jenuh atau kromofor (Hendayana, et al. 1994; Fessenden, & Fessenden, 1991).

Untuk mendeteksi gugus kromofor dari struktur senyawa [A] maka dilakukan analisis serapan sinar UV. Pada Gambar 4.3 diperlihatkan spektrum UV dari larutan yang mengandung senyawa [A] discanning sekitar panjang gelombang UV,  $\lambda = 200\text{--}400$  nm. Hasil absorpsi molekul senyawa [A] memberikan serapan maksimal kurva dengan panjang gelombang (pelarut MeOH) sebagai berikut: 233, 247, 250, 303 dan 355 nm. Puncak pada panjang gelombang maksimum pada 233 nm menunjukkan adanya transisi elektronik dari  $n \rightarrow \pi^*$  yang disebabkan adanya gugus karbonil dari ester (R-CO-OR) (Simon, 1989; Sudjadi, 1985; Williams & Fleming, 1989). Absorpsi pada panjang gelombang 247, 250, 303, 355 diduga akibat transisi elektronik dari  $\pi \rightarrow \pi^*$  dan  $n \rightarrow \pi^*$  dengan ditandai oleh 4 sinyal/pita yang berasal dari sistem aromatik heterosiklik (Pavia et al. 2009). Gugus benzena mengabsorpsi dengan pada puncak pertama  $\lambda_{\max}$  247 nm dan selanjutnya dengan adanya konyugasi dengan gugus OH yang merupakan substituen pada gugus benzena (auksokrom) maupun gugus karbonil jembatan,  $\lambda_{\max}$  pada puncak-puncak berikutnya bergeser ke panjang gelombang yang lebih panjang (pergeseran batokromik) yaitu puncak pada  $\lambda_{\max}$  250, 303, dan 355 nm. Pergeseran ke arah panjang gelombang lebih besar pada hasil spektrum tersebut kemungkinan disebabkan oleh delokalisasi elektron  $\pi^*$  dalam molekul karena adanya proses konjugasi elektron yang dapat menyebabkan elektron dapat berpindah tempat dalam molekul yang mengandung dua sistem aromatik. Delokalisasi elektron memberikan pengaruh terhadap penurunan tingkat energi orbital  $\pi^*$  dan membuat kurang bersifat *antibonding*, akibatnya absorpsi maksimum bergeser ke arah panjang gelombang yang lebih besar (Hendayana et al. 1994).

Keempat sinyal menunjukkan intensitas yang cukup tinggi, yang dalam hal ini pada  $\lambda = 233, 250, 305, 355$  nm (Gambar 4.3). Ini menunjukkan adanya kerangka xanthon yang biasanya teramati pada daerah 220–410 nm dengan sekitar tiga atau empat pita/sinyal dari suatu absorpsi maksimum (Roberts, 1961).



**Gambar 4.3. Spektrum UV senyawa [A]**

Identifikasi gugus-gugus fungsional tertentu pada suatu molekul dapat ditentukan dengan mengukur serapan radiasi infra merah (IR) menggunakan instrumen spektrofotometer infra merah (FT-IR) pada berbagai frekuensi yang dinyatakan dalam fungsi bilangan gelombang  $4000\text{--}500\text{ cm}^{-1}$ . Letak pita serapan dinyatakan dalam satuan panjang gelombang ( $\lambda\ \mu\text{m}$ ) atau bilangan gelombang ( $\nu\text{ cm}^{-1}$ ). Keuntungan penggunaan metode FT-IR adalah karena tidak harus menggunakan monokromator sehingga seluruh selang/range radiasi dapat dilewatkan melalui sampel secara simultan, oleh karena itu waktu analisis bisa lebih cepat. Selain itu instrumen FT-IR juga mempunyai resolusi yang cukup tinggi ( $\leq 0,001\text{ cm}^{-1}$ ) (Silverstein et al. 2005).

Berdasarkan hasil analisis FT-IR (Lampiran 3) yang ditunjukkan dalam Tabel 4.1, diketahui bahwa produk senyawa [A] yang merupakan salah satu senyawa turunan sulokrin mempunyai pita serapan pada  $\nu = 1693 \text{ cm}^{-1}$  dan  $1658 \text{ cm}^{-1}$  yang merupakan pita serapan vibrasi ulur ikatan karbonil keton ( $-\text{C}=\text{O}$ ) dan karbonil ester ( $-\text{C}=\text{O}$ ) yang terkonyugasi dengan gugus fenil dengan vibrasi ulur  $\nu = 1608\text{--}1514 \text{ cm}^{-1}$ . Daerah vibrasi ulur  $\nu = 1658 \text{ cm}^{-1}$  ini spesifik untuk senyawa xanthon (Roberts, 1961). Adanya gugus ester juga diperkuat dengan adanya pita serapan vibrasi ulur C-O ester pada  $\nu = 1384 \text{ cm}^{-1}$ . Adanya gugus aromatik terlihat pada bilangan gelombang  $3064 \text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya ikatan C-H aromatik, yang didukung oleh serapan pada  $\nu = 1608 \text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya ikatan  $-\text{C}=\text{C}-$  aromatik.

Berbeda dengan nilai serapan C=O di atas pita serapan pada  $\nu = 3354 \text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus  $-\text{OH}$  yang membentuk jembatan hidrogen yang diperkuat oleh pita serapan pada  $\nu = 1213 \text{ cm}^{-1}$  yang merupakan vibrasi dari gugus aromatik ( $-\text{C}-\text{OH}$ ). Pita serapan yang kuat dari suatu vibrasi ulur eter aromatik (C-O-C) terlihat pada  $\nu = 1255 \text{ cm}^{-1}$  dan  $1028 \text{ cm}^{-1}$ , yang juga diperkuat dengan munculnya pita serapan vibrasi ulur  $\nu = 2848 \text{ cm}^{-1}$ . Sementara itu vibrasi ulur C-H alifatik muncul pada  $\nu = 2953 \text{ cm}^{-1}$  yang didukung oleh serapan pada  $\nu = 1334 \text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{CH}_3$ ) (Pavia et al. 2009; Silverstein et al. 2005; Sastrohamidjojo, H, 1992).

**Tabel 4.1. Daftar daerah spektrum gugus fungsi senyawa [A]**

Jenis ikatan	Daerah absorpsi ( $\nu$ $\text{cm}^{-1}$ )
C=O	1693, 1658
C-O	1384
C=C aril	3064
C-H aril	1608
O-H (terikat ikatan hidrogen)	3354
C-OH	1213
C-O-C	1255,1028
C-H ( $\text{sp}^3$ )	2953
C-C	1334

Hasil kromatogram senyawa [A] (Lampiran 5) menunjukkan waktu retensi 2,0 menit dengan bobot molekul produk hasil sintesis adalah 300 m/z ( $M+H = 300+1$ ) (Chen et al. 2007; Eichhorn & Knepper, 2001).

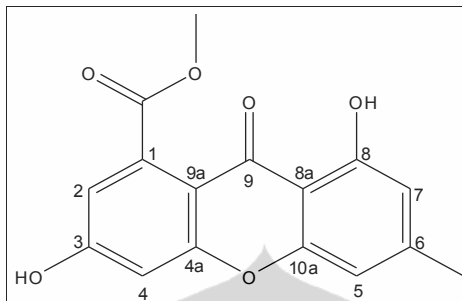
Spektroskopi NMR mempelajari struktur molekul melalui pengukuran interaksi inti-inti tertentu dengan radiasi elektromagnetik frekuensi radio apabila inti-inti berada dalam medan magnet. Radiasi frekuensi radio yang digunakan dalam NMR adalah 200–700 MHz (Macomber, 1998).

Sinyal NMR yang terukur berupa nilai pergeseran kimia ( $\delta$ ) dalam satuan ppm. Nilai  $\delta$  merupakan perbedaan resonansi frekuensi suatu inti relatif terhadap standar (Janie et al. 2006). Spektrum pengukuran  $^1\text{H}$ -NMR dan  $^{13}\text{C}$ -NMR menggunakan tetrametilsilan (TMS) sebagai standar. TMS mempunyai 12 atom H dan 4 atom C yang ekuivalen sehingga memberikan nilai pergeseran kimia dalam bentuk singlet yang muncul pada daerah medan magnet yang tinggi ( $\delta = 0$  ppm) (Pavia, et al. 2009; Silverstein et al. 2005).

Kepastian bahwa senyawa produk reaksi siklisasi tersebut merupakan senyawa metil 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-karboksilat [A] dipastikan dengan spektrum  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -HNMR, HMBC, dan HMQC



(Lampiran 7) yang memberikan sinyal-sinyal pergeseran kimia (Tabel 4.2.) dengan panduan Gambar 4.4 sebagai berikut :



**Gambar 4.4. Struktur senyawa metil 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-karboksilat [A]**

Proton metil dari gugus metil aromatik ditunjukkan dengan adanya puncak pada  $\delta$  2,38 ppm (3H, s,  $-\text{CH}_3$ ) yang menunjukkan adanya pergeseran kimia dari tiga buah proton yang berasal dari sebuah gugus metil yang tidak memiliki tetangga dengan atom hidrogen lain karena metil ini terikat langsung pada cincin aromatik pada posisi C-6 (karbon aromatik kuartener) sehingga muncul pada daerah yang lebih downfield. Puncak pada  $\delta$  3,86 ppm (3H, s,  $-\text{OCH}_3$ ) merupakan puncak dari suatu proton gugus metoksi yang terikat langsung pada atom C=O ester yang terhubung dengan atom elektronegatif yaitu oksigen sehingga puncak dari tiga proton metoksi ini muncul singlet pada daerah yang lebih downfield hal ini dikarenakan proton bersifat takterlindungi. Adanya puncak-puncak pergeseran kimia proton aromatik pada  $\delta$  6,63 ppm (1H, d, aromatik  $-\text{CH}-$ ); 6,83 ppm (1H, d, 2,25 Hz, aromatik  $-\text{CH}-$ ); 6,85 ppm (1H, d, aromatik  $-\text{CH}-$ ) dan 6,91 ppm (1H, d, 2,25 Hz) menunjukkan pergeseran kimia empat buah proton metin pada gugus aromatik berturut-turut pada posisi C-5, C-4, C-7 dan C-2. Gugus hidroksi ( $-\text{OH}$ ) yang terikat langsung pada cincin aromatik pada posisi C-8 dan membentuk ikatan hidrogen (jembatan hidrogen) karena posisinya berdekatan dengan gugus karbonil keton sehingga pergeseran kimianya muncul pada daerah yang lebih downfield yaitu 12,29 ppm (1H, s,  $-\text{OH}$ ).

Puncak-puncak spektrum  $^{13}\text{C}$ -NMR untuk gugus metil dan metoksil muncul pada  $\delta$  21,91 ppm dan  $\delta$  52,61 ppm yang menunjukkan adanya dua karbon metil pada posisi C-6 dan pada gugus karbonil ester. Puncak pada  $\delta$  179 ppm adalah puncak gugus karbonil (C-9) dari keton jembatan (terhubung pada dua gugus aromatik) yang muncul lebih downfield dibandingkan dengan gugus karbonil pada ester. Atom karbon yang mengikat gugus hidroksi dan atom karbon dari gugus karbonil ester ditunjukkan masing-masing pada nilai pergeseran kimia  $\delta$  160,44 ppm, 164,26 ppm dan 168,29 ppm berturut-turut pada posisi C-8, C-3, dan C-1. Untuk atom-atom karbon metin ditunjukkan secara berturut-turut oleh puncak spektrum  $^{13}\text{C}$ -NMR pada nilai pergeseran kimia  $\delta$  103,19 ppm (C-2); 107,28 ppm (C-7); 111,13 ppm (C-5) dan 112,83 ppm (C-4). Sementara itu puncak-puncak karbon kuartener ditunjukkan masing-masing pada posisi C-8a, C-9a, C-10a, C-4a, dan C-1 memiliki nilai pergeseran kimia berturut-turut  $\delta$  105,70 ppm, 108,93 ppm, 148,65 ppm, 157,63 ppm dan 134,93 ppm.

Berdasarkan hasil analisis menggunakan KLT, UV, FT-IR, LC-MS,  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR serta korelasi H-C berdasarkan spectrum HMQC dan HMBC membuktikan bahwa senyawa [A] adalah metil 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-karboksilat berhasil disintesis dan senyawa ini memiliki tingkat kemurnian yang cukup tinggi.

**Tabel 4.2. Data pergeseran kimia dari spektrum HMQC (<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR) dan HMBC senyawa [A]**

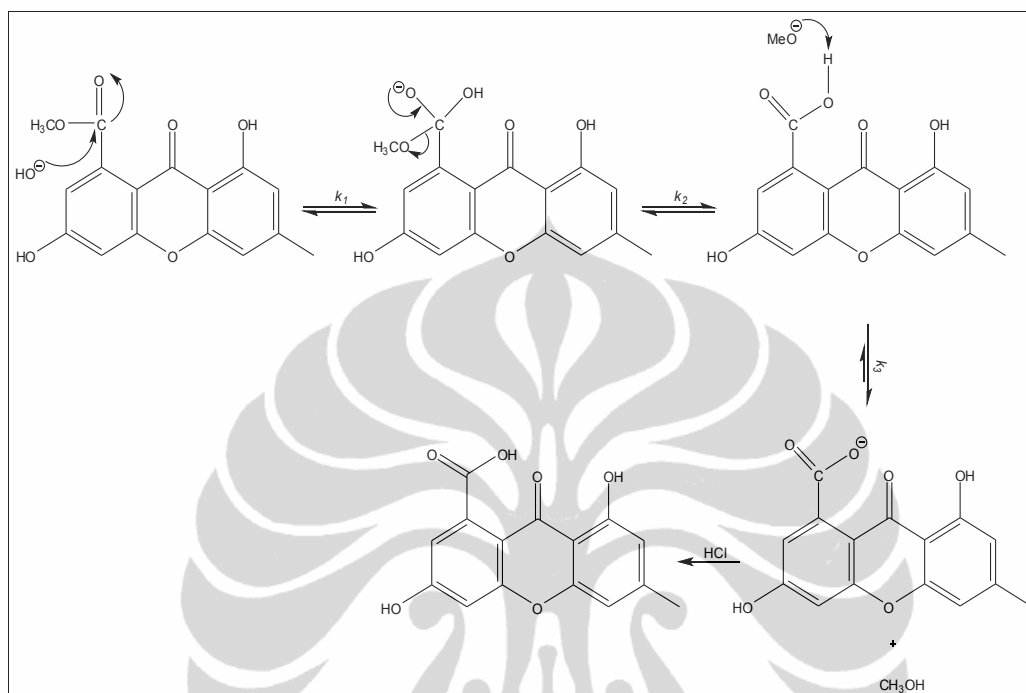
No.	HMQC (δ ppm)		HMBC <sup>13</sup> C-NMR(δ ppm)
	<sup>13</sup> C-NMR(δ ppm)	<sup>1</sup> H-NMR (m*, J dalam Hz)	
1	134,93	-	-
2	103,19	6,91(1H, d, 2,25 Hz)	108,93; 112,82; 157,63; 164,26
3	164,26	-	-
4	112,83	6,83 (1H, d, 2,25 Hz)	103,19; 108,93; 168,29
4a	157,63	-	-
5	111,13	6,63	21,91; 105,70; 107,28; 160,44
6	155,18	-	-
7	107,28	6,85	21,91; 105,70; 111,13; 155,18
8	160,44	-	-
8a	105,70	-	-
9	179,00	-	-
9a	108,93	-	-
	168,29 (C=O ester)	-	-
	21,91 (≡C-CH <sub>3</sub> )	2,38	111,13; 107,29; 148,65
	52,61 (CO-O-CH <sub>3</sub> )	3,86	168,29
	-	12,29 (-OH)	105,70; 111,13; 160,44
10a	148,65	-	-

m\*= multiplisitas, J = konstanta kopling

#### 4.1.2 Sintesis Senyawa asam 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-karboksilat [B]

Reaksi sintesis senyawa [B] mengikuti mekanisme reaksi yang tertera pada Gambar 4.5 berikut. Dalam hal ini reaksi pembentukan produk senyawa [B] terjadi secara simultan dengan produk [A]. Tahap pertama dari mekanisme ini adalah adisi ion hidroksida terhadap gugus karbonil, yaitu penyerangan gugus karbonil metil ester yang merupakan substituen pada gugus aromatik produk [A] oleh nukleofil <sup>-</sup>OH. Pada tahap ini terjadi pemutusan ikatan π atom karbon

trigonal ( $sp^2$ ) dari suatu gugus karbonil menjadi bentuk tetrahedral intermediet ( $sp^3$ ) yang memiliki sifat tidak stabil.



**Gambar 4.5. Mekanisme reaksi sintesis senyawa asam 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-karboksilat [B]**

Ketidakstabilan bentuk tetrahedral intermediet ini dapat dengan mudah menyebabkan terjadinya eliminasi gugus metoksi dari ester sehingga terbentuk kembali gugus karbonil melalui lepasnya gugus pergi ion metoksida. Selanjutnya dari reaksi ini mengarahkan terbentuknya asam karboksilat yang dapat bereaksi kembali dengan ion metoksida melalui kesetimbangan yang cepat ( $K_3$ ) menghasilkan bentuk anion karboksilat diikuti dengan eliminasi metanol. Anion karboksilat kemudian bereaksi dengan  $H^+$  dari HCl menghasilkan bentuk bentuk karboksilat.

Secara kinetik hidrolisis ester oleh basa merupakan reaksi orde kedua, orde pertama pada ester dan orde pertama pada ion hidroksida (Hine J, 1962).

Meskipun  $K_1$  dan  $K_2$  sama, tetapi  $K_3$  sangat besar ( $pK_a RCO_2H \approx 4,2$  dan MeOH

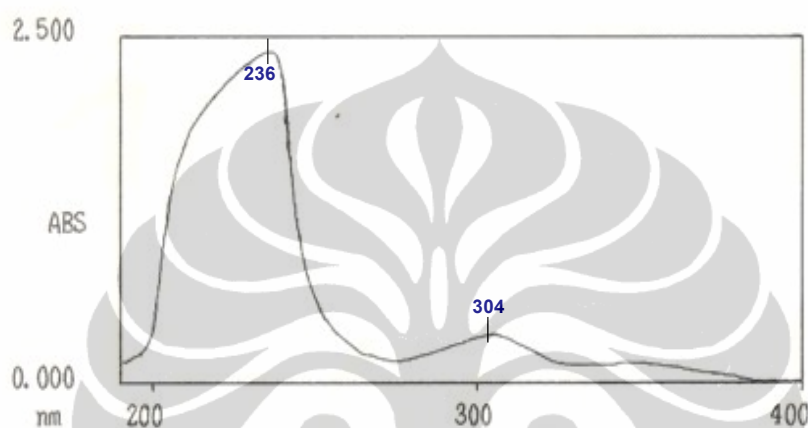
$\approx 16$  sehingga perbedaan diantara keduanya ( $Ka \approx 10^{11}$ ) dan kesetimbangan ini lebih mendorong reaksi kearah kanan yaitu terbentuknya anion karboksilat.

Untuk mendeteksi pembentukan produk reaksi hidrolisis [B] dilakukan identifikasi awal secara kualitatif dengan KLT menggunakan fase diam silika gel dan eluen kloroform dan metanol (75:25) sebagai fase gerak. Pertimbangan penggunaan komposisi eluen tersebut dikarenakan senyawa produk hasil sintesis cenderung bersifat polar. Spot yang terbentuk untuk produk memberikan nilai  $R_f$  0,4 adalah spot yang serupa dengan produk siklik karboksilat [B]. Spot ini terlihat di bawah lampu UV pada  $\lambda = 254$  dan  $365$  nm tak berwarna. Senyawa turunan xanthon ini akan memberikan warna kuning terang setelah disemprot dengan penampak bercak asam sulfat (Robert, 1961).

Untuk mendapatkan produk senyawa [B] dilakukan teknik pemurnian dengan kolom kromatografi, produk senyawa [B] ini diperkirakan adalah asam 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-karboksilat. Sintesis reaksi hidrolisis menghasilkan rendemen yang lebih tinggi (40,32 %) dengan perbandingan mol sulokrin terhadap basa KOH yaitu 1:5, sementara itu rendemen senyawa [B] cenderung semakin menurun dengan berkurangnya konsentrasi basa KOH (11,04 % pada perbandingan 1:1). Senyawa [B] berupa padatan serbuk berwarna kuning muda.

Analisis gugus kromofor dari struktur senyawa [B] diamati dengan serapan sinar UV. Pada Gambar 4.6 diperlihatkan spektrum UV dari larutan yang mengandung senyawa [B] *discanning* sekitar panjang gelombang UV,  $\lambda = 200-400$  nm. Hasil absorpsi molekul senyawa [B] memberikan serapan maksimal kurva dengan panjang gelombang (pelarut MeOH) sebagai berikut: 236 dan 304 nm. Puncak panjang gelombang maksimum pada 236 nm menunjukkan adanya transisi elektronik dari  $n \rightarrow \pi^*$  yang disebabkan adanya gugus karbonil dari (R-CO-OH) (Simon, 1989; Sudjadi, 1985; Williams & Fleming, 1989). Absorpsi pada panjang gelombang 304 nm diduga akibat transisi elektronik dari  $\pi \rightarrow \pi^*$  dengan

ditandai oleh sebuah sinyal/pita yang berasal dari sistem ikatan rangkap terkonyugasi (Pavia et al. 2009). Konyugasi yang lebih panjang ini menyebabkan lebih dari dua orbital  $\pi$  ikatan saling tumpang tindih sehingga perbedaan tingkat energinya semakin kecil dan serapan terjadi pada panjang gelombang lebih panjang.



**Gambar 4.6. Spektrum UV senyawa [B]**

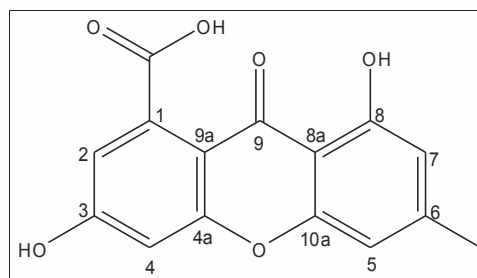
Penafsiran spektrum FTIR berdasarkan data spektrum pada Lampiran 4 dan daftar daerah spektrum tercantum pada Tabel 4.3, menunjukkan bahwa produk senyawa [B] mempunyai pita serapan yang sangat melebar pada  $\nu = 3334\text{--}2380\text{ cm}^{-1}$  yang merupakan pita serapan vibrasi ulur  $\text{--OH}$  dari karboksilat (ikatan hidrogen yang kuat), karbonil asam karboksilat ( $\text{--C=O}$ ) pada vibrasi ulur  $1707\text{ cm}^{-1}$  dan didukung oleh pita serapan C-O dengan vibrasi ulur  $1271\text{ cm}^{-1}$ . Adanya gugus karbonil keton ( $\text{--C=O}$ ) yang terkonyugasi dengan dua gugus aromatik menyebabkan munculnya pita serapan vibrasi ulur pada  $\nu = 1643\text{ cm}^{-1}$ . Daerah vibrasi ulur  $\nu = 1643\text{ cm}^{-1}$  ini spesifik untuk senyawa xanthon (Roberts, 1961). Gugus aromatik terlihat pada bilangan gelombang  $3089\text{--}3066\text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya ikatan C-H aromatik ( $=\text{C-H}$ ), yang didukung oleh serapan pada  $\nu = 1598\text{--}1419\text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya ikatan  $\text{--C=C--}$  aromatik.

Gugus substituen –OH pada aromatik terlihat dari pita serapan vibrasi ulur pada  $\nu = 3522\text{--}3334\text{ cm}^{-1}$  yang diperkirakan membentuk jembatan hidrogen diperkuat dengan pita serapan pada  $\nu = 1205\text{--}1026\text{ cm}^{-1}$  yang merupakan vibrasi dari gugus aromatik (-C-OH). Sementara itu vibrasi ulur C-H alifatik muncul pada  $\nu = 2993\text{--}2931\text{ cm}^{-1}$  yang didukung oleh serapan pada  $\nu = 1371\text{--}1325\text{ cm}^{-1}$  (-CH<sub>3</sub>) (Pavia et al. 2009; Silverstein et al. 2005; Sastrohamidjojo, 1992).

**Tabel 4.3. Daftar daerah spektrum gugus fungsi senyawa [B]**

Jenis ikatan	Daerah absorpsi ( $\nu\text{ cm}^{-1}$ )
O–H (karboksilat)	3334–2380
–C=O (karboksilat)	1707
C–O	1271
C=O (keton terkonyugasi aril)	1643
=C–H	3089–3066
–C=C	1598–1419
–C–OH	1205–1026
C–H	2993–2931
C–C	1371–1325

Analisis bobot molekul menggunakan LC-MS menunjukkan bahwa senyawa [B] (Lampiran 6) dengan waktu retensi 3,8 menit memiliki bobot molekul 286 m/z ( $M+H=286+1$ ) (Chen et al. 2007; Eichhorn & Knepper, 2001). Kepastian bahwa senyawa produk reaksi hidrolisis tersebut merupakan senyawa asam 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-karboksilat [B] dipastikan dengan spektrum <sup>1</sup>H-NMR (Lampiran 8) yang memberikan sinyal-sinyal pergeseran kimia (Tabel 4.4.) dengan panduan Gambar 4.7. sebagai berikut:



**Gambar 4.7. Struktur senyawa asam metil 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-karboksilat [B]**

Gugus metil aromatik ditunjukkan dengan adanya puncak pada  $\delta$  2,39 ppm (3H, s,  $-\text{CH}_3$ ) yang menunjukkan adanya pergeseran kimia dari tiga buah proton yang berasal dari sebuah gugus metil yang tidak memiliki tetangga dengan atom hidrogen lain karena terikat langsung pada posisi C-6 (karbon kuartener) sehingga muncul pada daerah yang lebih downfield. Adanya puncak-puncak pergeseran kimia proton aromatik pada  $\delta$  6,53 ppm (1H, aromatik  $-\text{CH}-$ ); 6,63 ppm (1H, d, 2,45 Hz, aromatik  $-\text{CH}-$ ); 6,64 ppm (1H, d, 2,45 Hz, aromatik  $-\text{CH}-$ ) dan 6,71 ppm (1H, aromatik  $-\text{CH}-$ ) menunjukkan pergeseran kimia empat buah proton metin pada gugus aromatik berturut-turut pada posisi C-4, C-5, C-7 dan C-2.

**Tabel 4.4. Data pergeseran kimia dari spectra  $^1\text{H-NMR}$  senyawa [B]**

No.	Pergeseran kimia ( $\delta$ ) ppm $^1\text{H-NMR}$ ( $m^*$ , $J$ dalam Hz)
2	6,71
4	6,53
5	6,63 (1H, d, 2,45Hz)
7	6,64 (1H, d, 2,45Hz)
$\text{CH}_3$	2,39

$m^*$ = multiplisitas,  $J$  = konstanta kopling

Berdasarkan hasil analisis menggunakan KLT, UV, FT-IR, LC-MS, dan  $^1\text{H-NMR}$ , membuktikan bahwa senyawa [B] adalah asam 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-karboksilat.



## 4.2 Optimasi Sintesis Senyawa [A] dan Senyawa [B]

Optimasi pembentukan produk dilakukan dengan memvariasi perbandingan jumlah mol bahan baku awal sulokrin terhadap reagen KOH dengan kondisi suhu yang tetap (100 °C). Pemanasan diperlukan dengan tujuan untuk menaikkan energi kinetik, yaitu semakin memperbanyak tumbukan antar molekul sehingga reaksi berlangsung lebih cepat. Waktu reaksi yang dibutuhkan bertujuan untuk menyempurnakan reaksi. Adapun hasil optimasi diperlihatkan pada Tabel 4.5 berikut. Teramati bahwa senyawa [A] dihasilkan dengan rendemen tertinggi yaitu, 65,56 % pada perbandingan mmol 1:1 dan semakin menurun dengan bertambahnya konsentrasi KOH. Sementara itu senyawa [B] dihasilkan dengan rendemen tertinggi yaitu, 40,32 % pada perbandingan mmol 1:5 dan cenderung semakin menurun dengan berkurangnya konsentrasi KOH. Fenomena ini mengindikasikan bahwa reaksi siklisasi menjadi produk utama yaitu senyawa [A] dengan kondisi konsentrasi basa yang ekuivalen dengan bahan baku awal, namun apabila basa KOH dalam jumlah berlebih ditambahkan maka reaksi akan menghasilkan produk hidrolisis sebagai produk utama yaitu senyawa [B]. Dengan kata lain peningkatan konsentrasi KOH meningkatkan reaksi hidrolisis substituen gugus ester pada produk senyawa [A], sehingga diperoleh rendemen produk senyawa [B] yang lebih tinggi. Sementara itu untuk menghasilkan produk tunggal senyawa [A] maka diperkirakan konsentrasi sulokrin lebih ditingkatkan sehingga reaksi siklisasi menjadi lebih utama dengan adanya konsentrasi katalis KOH yang diturunkan.

**Tabel 4.5 Persentase jumlah produk senyawa [A] dan senyawa [B] dengan variasi perbandingan sulokrin terhadap KOH**

Rendemen	mmol sulokrin : mmol KOH				
	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5
senyawa [A]	65, 56%	62, 88%	56, 00%	56, 88%	53, 33%
senyawa [B]	11, 04%	35, 89%	37, 76%	38, 46%	40, 32%

### 4.3 Uji Bioaktivitas Senyawa metil 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-karboksilat [A]

#### 4.3.1 Uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Uji aktivitas senyawa [A] diawali dengan uji pendahuluan untuk mengetahui efek toksisitas ( $LC_{50}$ ) senyawa melalui metode *brine shrimp lethality test* (BSLT). Uji BSLT dilakukan terhadap senyawa [A] menggunakan konsentrasi 10, 100, 500 dan 1000 ppm dalam media air laut dan dilakukan dengan 3 kali ulangan (triplo) dengan menggunakan larva udang *A. salina* Leach. masing-masing sebanyak 10 ekor/konsentrasi. Proses penetasan telur *A. salina* Leach. sampai dengan menjadi larva membutuhkan waktu 48 jam, dan mulai dari penambahan sampel uji terhadap larva udang sampai dengan proses perhitungan membutuhkan waktu 24 jam. Jumlah larva udang yang mati dan hidup dihitung, untuk kemudian ditentukan persentase kematian dengan cara membagi larva udang yang mati dengan jumlah larva udang hidup dikurangi kontrol. Nilai  $LC_{50}$  diperoleh melalui analisis regresi linear. Rata-rata hasil uji toksisitas senyawa [A] pada berbagai konsentrasi dapat dilihat pada Lampiran 9.

Dari hasil tersebut diketahui bahwa senyawa [A] mempunyai tingkat toksisitas yang cukup tinggi yaitu 32,84 ppm, jika digunakan dasar yang diambil dari Meyer (1992) yang menyatakan bahwa suatu senyawa mempunyai efek toksisitas yang signifikan (tinggi) jika mempunyai nilai  $LC_{50} \leq 50$  ppm.

Perhitungan nilai  $LC_{50}$  dilakukan melalui kurva regresi linear dengan memplot % kematian udang terhadap log konsentrasi dari masing-masing senyawa uji sehingga diperoleh konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% larva udang *A. salina* Leach.

#### 4.3.2 Sitotoksitas Senyawa [A] terhadap Sel Kanker Payudara *YMB-1*, Sel Kanker Leukemia *HL60*, dan Sel Kanker Kulit *KB* secara *in vitro*

Aktivitas biologi senyawa [A] diuji terhadap sel kanker payudara *YMB-1*, sel kanker leukemia *HL60*, dan sel kanker kulit *KB* secara *in vitro* terhadap sel. Uji aktivitas sitotoksik ini dilakukan dengan metode MTT (3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromide (Alley, et.al.1988 diacu dalam Sahidin et.al., 2005) dengan konsentrasi penambahan senyawa uji dalam ragam konsentrasi 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; dan 100 µg/mL. Sebagai kontrol positif digunakan senyawa antikanker Antimisin A<sub>3</sub> dengan ragam konsentrasi yang sama.

Pengujian MTT adalah suatu standar pengujian laboratorium secara kolorimetri (metode pengukuran berdasarkan perubahan warna yang terjadi) karena mengukur pertumbuhan/perkembangbiakan sel. Metode ini digunakan untuk menentukan sitotoksitas zat-zat yang berpotensi sebagai obat. Sel hidup mempunyai kemampuan untuk mengubah warna MTT menjadi berwarna ungu, sebaliknya bagi sel mati MTT tetap berwarna kuning. Dalam sel hidup, enzim reduktase mitokondria adalah aktif sehingga pewarna kuning MTT dapat direduksi oleh enzim tersebut menjadi formazan ungu yang mempunyai panjang gelombang,  $\lambda = 550 \text{ nm}$ . Hasil uji sitotoksitas senyawa [A] dapat dilihat pada Tabel berikut.

**Tabel 4.6 Hasil uji sitotoksitas senyawa [A] terhadap sel kanker *YMB-1*, *HL60*, dan sel kanker *KB***

Sel	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
<i>YMB-1</i>	121,1
<i>HL60</i>	89,4
<i>KB</i>	146,9

Berdasarkan tabel di atas, senyawa [A] mempunyai aktivitas antikanker terhadap sel kanker leukemia *HL60*, jika dibandingkan dengan aktivitasnya terhadap sel kanker payudara *YMB-1* dan sel kanker kulit *KB*. Meskipun aktivitas

ini masih cukup rendah yaitu 89,4  $\mu\text{g/mL}$ , karena suatu senyawa hasil sintesis aktivitas sitotoksitasnya dinyatakan aktif jika mempunyai nilai  $\text{IC}_{50}$  dibawah 30  $\mu\text{g/mL}$ .

Gugus fungsi seperti fenol yang ada pada senyawa [A] tersebut diperkirakan mempunyai peranan penting dalam aktivitas. Gugus OH pada senyawa diduga mempunyai interaksi pengikatan senyawa pada sisi pengikatan (*binding site*) sel target melalui ikatan hidrogen yang terlibat antara dua molekul yang bekerja sebagai donor dan akseptor. Donor ikatan hidrogen adalah proton dari fenol yang menempel pada atom oksigen yang bersifat elektronegatif dan sebagai akseptornya adalah gugus-gugus OH yang ada pada sel target (Patrick, 2001). Juga adanya bentuk senyawa karbonil tak jenuh  $\alpha, \beta$  dari senyawa [A] memungkinkan terjadinya reaksi antara DNA polimerase dan senyawa ini melalui reaksi adisi konyugasi suatu tiol (gugus SH dari suatu residu enzim sistein) pada gugus karbonil tak jenuh (Clayden et al. 2000).

## BAB 5

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa :

1. Sintesis senyawa turunan sulokrin metil 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-karboksilat [A] dan asam 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-karboksilat [B] berhasil disintesis dengan rendemen masing-masing sebesar 65,56 % dan 11,04 %.
2. Optimasi sintesis senyawa [A] dan [B] melalui variasi perbandingan mol bahan baku awal sulokrin terhadap basa KOH dengan perbandingan 1:1 memberikan nilai rendemen tertinggi 65,56 % untuk senyawa [A] dan perbandingan 1:5 memberikan rendemen tertinggi 40,32 % untuk senyawa [B].
3. Hasil uji toksisitas terhadap larva udang *A. salina* Leach menunjukkan bahwa senyawa [A] mempunyai aktivitas yang signifikan dengan nilai  $LC_{50}$  sebesar 32,84 ppm.
4. Uji sitotoksitas senyawa [A] menunjukkan bahwa senyawa memiliki aktivitas dalam menghambat pertumbuhan sel kanker *HL60* dengan nilai  $IC_{50}$  89,40  $\mu\text{g/mL}$ , sementara itu untuk sel *YMB-1* dan *KB* masing-masing memiliki nilai  $IC_{50}$  121,1 dan 146,9  $\mu\text{g/mL}$ .

## 5.2 Saran

Perlu adanya penelitian yang lebih komprehensif terhadap sintesis senyawa turunan sulokrin dan melakukan optimasi dengan variasi suhu serta katalis yang berbeda-beda.



## DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto, Y., Fauzy, M. F., & Setiawati, A. October 21, 2010.  
<http://ccrcfarmasiugm.wordpress.com/ensiklopedia-kanker/kanker/>
- Akao, Y., et al. (2008). Anti-Cancer Effects of Xanthones from Pericarps of Mangosteen. *Int. J. Mol. Sci.*, 9, 355–370.
- Berridge, M. V., et al. (1996). The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica*, 4, 14-19
- Bioaustralis fine chemicals, Product Data Sheet. *Sulochrin*. February 22, 2010.  
<http://www.bioaustralis.com>.
- Budi, G.S. (2006). *Identifikasi Senyawa Bioaktif Ekstrak Kulit Batang Tanjung (Bruguiera gymnorrhiza) dalam Etanol dan Uji Sitotoksitasnya terhadap Sel HeLa*. Skripsi. Program Sarjana, MIPA UNSOED, Purwokerto.
- Cammack, R., et al. (Ed.). (1997-2006). *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology* (2nd ed.). New York: Oxford University Press.
- Carey, F.A., & Sunberg, R.J.(2001). *Advanced Organic Chemistry: Part A, Structure and Mechanism* (4th ed). Virginia: Kluwer Academic/ Plenum
- Castanheiro, R. A. P., et al. (2009). Antitumor Activity of Some Prenylated Xanthones. *Pharmaceuticals*, 2, 33–43.
- Chao, S-G., et al. (1998). Novel Cytotoxic Polyprenylated Xanthonoids from *Garcinia gaudichaudii* (Guttiferae). *Tetrahedron*, 54(36), 10915–10924.
- Chen, G., Zhang, Li-Kang., & Pramanik, B. N. (2007). LC/MS: Theory, Instrumentation, and Applications to Small Molecules. In Y. Kazakevich & R. LoBrutto (Ed). *HPLC for Pharmaceutical Scientist*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Chi-Kuan, H., Huang, Y-L., & Chen, C-C. (2002). Garcinone E, A Xanthone Derivative has Potent Cytotoxic Effect Against Hepatocellular Carcinoma Cell Lines. *Planta Medica*, 68, 975–979.

- Clayden, J., et al. (2000). *Organic Chemistry*. New York: Oxford University Press.
- Denisova-D, O. A., & Glyzin, V.I. (1982). Natural Xanthones. *Russian Chemicals Reviews*, 51, 1007–1019.
- Eichhorn, P., & Knepper, T.P. (2001). Electrospray ionization mass spectrometric studies on the amphoteric surfactant cocamidopropylbetaine. *Journal of Mass Spectrometry*, 36, 677–684 .
- Fessenden, R. J., & Fessenden, J. S. (1991). *Kimia Organik*, Jilid 1 Ed. ke-3 (Pudjaatmaka, A. H, Penerjemah). Jakarta: Erlangga.
- Fotakis, G., & Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160, 171-177.
- Graham, J.B., & Lee, H-H. (1989). Review article number 43: Xanthones from Guttiferae. *Phytochemistry*, 28(4), 967–998.
- Hamasaki, T., & Kimura, Y. (1983). Isolation and Structures of Four New Metabolites from *Aspergillus wentii*. *Agric. Biol. Chem.*, 47(1), 163–165.
- Harbone, J.B., & Dey, P.M. (1991). *Method in Plant Biochemistry: 6 Assay for Bioactivity*. London: Academic Press.
- Hendayana, S., et al. (1994). *Kimia Analitik Instrumen*. Semarang: Press Semarang.
- Hine, J. (1962). *Physical Organic Chemistry* (2nd ed.). Tokyo: Kogakusha.
- House, E.J. (2008). *Inorganic Chemistry*. USA: Academic Press.
- <http://en.wikipedia.org/wiki/cancer>. November 18, 2010.
- [http://en.wikipedia.org/wiki/MTT\\_assay's](http://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay's). November 19, 2010.
- [http://en.wikipedia.org/wiki/potassium\\_hydroxide](http://en.wikipedia.org/wiki/potassium_hydroxide). November 11, 2010.
- <http://www.nano.lipi.go.id>. October 16, 2010.
- Janie, U. A., et al. (2006). *Teknik Modern Spektroskopi NMR : Teori dan Aplikasi dalam Elusidasi Struktur Molekul Organik dan Biomolekul*. Jakarta: LIPI Press.



- Kirby, A. J. (1972). Ester Formation and Hydrolysis and Related Reactions: Hydrolysis and Formation of Esters of Organic Acids. In C. H. Bamford & C. F. H. Tipper (Ed). *Comprehensive Chemical Kinetics* (Vol 10). New York: Elsevier.
- Klassen, C.D., 2001. *Toxicology : The basic Science of Poisons* (6th ed.). New York: McGraw-Hill.
- Macomber, R. S. (1998). *A Complete Introduction to Modern NMR Spectroscopy*. New York: John Wiley & Sons.
- Maioli, E., et al. (2009). Critical Appraisal of the MTT Assay in the Presence of Rottlerin and Uncouplers. *Biological Procedure Online*, vol 1, 227-240.
- Matsumoto, K., et al. (2003). Cytotoxic Benzophenone Derivatives from *Garcinia* Species Display a Strong Apoptosis Inducing Effects Against Human Cell Lines. *Biology Pharmaceutical Bulletin*, 26(4), 565–571.
- Matsumoto, K., et al. (2004). Preferential target is mitochondria in alpha-mangostin-induced apoptosis in human leukemia HL60 cells. *Bioorg. Med. Chem.*, 12(22), 5799–5806.
- Meyer, B. N., et al. (1992). Brine Shrimp: a Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*, 45, 31–34.
- Odile, T., et al. (2000). Cytotoxic Prenylxanthone from *Garcinia bractata*. *Journal of Natural Product*, 63(4), 441-446.
- Ohashi, H. (1998). Sulochrin inhibits eosinophil activation and chemotaxis. *Inflammation Research*, 47, 409–415.
- Ohashi, H., et al. (1999). Effects of ortho-Substituent Groups of Sulochrin on Inhibitory Activity to Eosinophil Degranulation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 9, 1945–1948.
- Patrick, G. L. (2001). *An Introduction to Medicinal Chemistry* (2nd ed.). New York: Oxford University Press.
- Pavia, D. L., et al. (2009). *Introduction to Spectroscopy*. Washington: Brooks/Cole.
- Peres, V., & Nagem, J. (1997). Review article number 117: Trioxxygenated Naturally Occuring Xanthenes. *Phytochemistry*, 44(2), 967–998.

- Rahman, Atta-ur., Choudhary, M. I., & Thomsen, W. J. (2001). *Bioassay Techniques for Drug Development*. Amsterdam: Harwood Academic.
- Rahmawati, N. (2004). *Uji Sitotoksitas Ekstrak Etanolik Daun Bandotan (Ageratum conyzoides L) terhadap Sel HeLa dan Profil Kromatografi Lapis Tipisnya*. Skripsi. Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Robert, J.C. (1961, February 21). Naturally Occuring Xanthenes. *England*, 591–605.
- Sadeghi-aliabadi, H., Ghasemi, N., & Kohi, M. (2008). Cytotoxic effect of *Convolvulus arvensis* extracts on human cancerous. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 3(1): 31-34.
- Sahidin, *et al.* (2005). Cytotoxic Properties of Oligostilbenoids from the tree barks of *Hopea dryobalanoide*. *J. Naturforsch*, 60, 723–727 .
- Sastrohamidjojo, H. (1992). *Spektroskopi Inframerah*. Yogyakarta: Liberty.
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., & Kiemle, D. J. (2005). *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. New York: John Wiley & Sons.
- Simon, W., Seibl, J., & Thomas, C. (1989). *Table of Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds* (K. Bielman. Ed). Berlin: Springer-Verlag.
- Siswondono. (2000). *Kimia Medisinal*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Siswondono. (2004). *Leukemia Peringkat Pertama Penyakit pada Anak*. November 18, 2010. <http://www.gizi.net/cgi-bin/berita/fullnews>.
- Siswandono & Soekardjo. (1995). *Kimia Medisinal*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Trmcic, M., & Hodgson, R.W. (2010). Kinetic studies and predictions on the hydrolysis and aminolysis of esters of 2-S-phosphorylacetates. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 6, 732–741.
- Sudjadi. (1985). *Penentuan Struktur Senyawa Organik*. Jakarta: Ghalia Indonesia.

- Suksamrarn, S., et al. (2003). Antibacterial Activity of Prenylated Xanthenes from the Fruits of *Garcinia mangostana*. *Chem. Pharm. Bull.*, 51(7), 857–859.
- Suksamrarn, S., et al. (2006). Cytotoxic Prenylated Xanthenes from the Young Fruits of *Garcinia mangostana*. *Chem. Pharm. Bull.*, 54(3), 301–305.
- Wolff, M. E. (1994). *Asas-Asas Kimia Medisinal* Ed. ke-4. (Mujadi, Sabikis, & Sumarno, Penerjemah). Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Yayasan Kanker Indonesia, (2008). *Apa Yang Harus Anda Ketahui Tentang Kanker*. Yayasan Kanker Indonesia. November 19, 2010.  
[http://news.indosiar.com/news\\_read.htm?id=21479](http://news.indosiar.com/news_read.htm?id=21479).
- Williams, D.H., & Fleming, I. (1989). *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry* (3rd ed.). United Kingdom: McGraw-Hill Book.
- WHO (<http://www.who.int/infobase/report.aspx>)



## LAMPIRAN

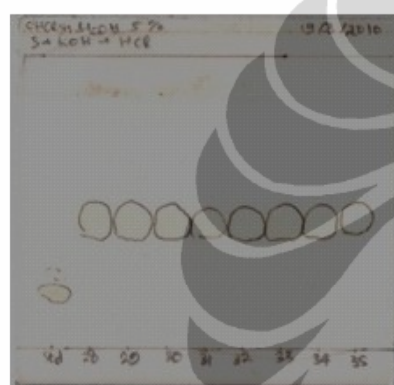
### Lampiran 1. Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT)



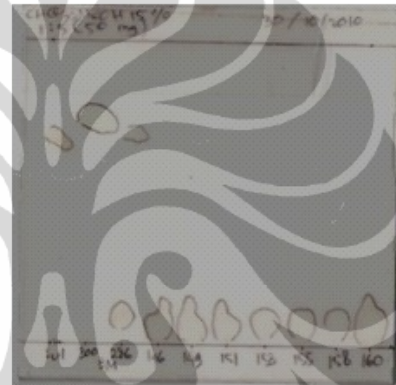
reaksi 24 jam



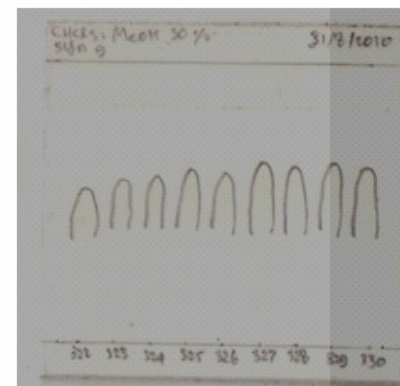
ekstrak Et-Ac



senyawa [A] hasil pemurnian



senyawa [B] hasil pemurnian



senyawa [B] hasil pemurnian

## Lampiran 2. Perhitungan rendemen hasil reaksi sintesis senyawa [A] dan [B]

1. a. Sintesis senyawa metil 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-karboksilat [A] dengan perbandingan sulokrin:KOH = 1 : 1

Sulokrin (BM 332,30 mg/mmol) : 20,3 mg = 0,06 mmol  
KOH (BM 56 mg/mmol) : 3,4 mg = 0,06 mmol  
Senyawa [A] (BM 300,26 mg/mmol) Hasil sintesis diperoleh 11,8 mg

	Sulokrin	+	KOH	→	senyawa [A]
Mula-mula :	0,06 mmol		0,06 mmol		
Reaksi :	0,06 mmol		0,06 mmol		0,06 mmol
Sisa	—		—		0,06 mmol

Produk secara teoritis = jumlah mol produk x BM produk  
= 0,06 mmol x 300,26 mg/mmol  
= 18,0 mg

Rendemen =  $\frac{\text{massa hasil sintesis}}{\text{massa teoritis}} \times 100\%$   
=  $\frac{11,8 \text{ mg}}{18,0 \text{ mg}} \times 100\% = 65,56\%$

Lanjutan perhitungan rendemen hasil reaksi sintesis senyawa [A] dan [B]

1. b. Sintesis senyawa 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-asam karboksilat [B] dengan perbandingan sulokrin:KOH=1:1

Sulokrin (BM 332,30 mg/mmol) : 20,3 mg = 0,06 mmol  
KOH (BM 56 mg/mmol) : 3,4 mg = 0,06 mmol  
Senyawa [B] (BM 286,24 mg/mmol) Hasil sintesis diperoleh 1,9 mg

	Sulokrin	+	KOH	→	senyawa [B]
Mula-mula :	0,06 mmol		0,06 mmol		
Reaksi :	0,06 mmol		0,06 mmol		0,06 mmol
Sisa	—		—		0,06 mmol

Produk secara teoritis = jumlah mol produk x BM produk  
= 0,06 mmol x 286,24 mg/mmol  
= 17,2 mg

Rendemen =  $\frac{\text{massa hasil sintesis}}{\text{massa teoritis}} \times 100\%$   
=  $\frac{1,9 \text{ mg}}{17,2 \text{ mg}} \times 100\% = 11,04\%$

Lanjutan perhitungan rendemen hasil reaksi sintesis senyawa [A] dan [B]

2. a. Sintesis senyawa metil 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-karboksilat [A] dengan perbandingan sulokrin:KOH = 1 : 2

Sulokrin (BM 332,30 mg/mmol) : 50,0 mg = 0,15 mmol

KOH (BM 56 mg/mmol) : 16,8 mg = 0,30 mmol

Senyawa [A] (BM 300,26 mg/mmol) Hasil sintesis diperoleh 28,3 mg

	Sulokrin	+	KOH	→	senyawa [A]
Mula-mula :	0,15 mmol		0,30 mmol		
Reaksi :	0,15 mmol		0,15 mmol		0,15 mmol
Sisa	—		0,15 mmol		0,15 mmol

Produk secara teoritis = jumlah mol produk x BM produk  
= 0,15 mmol x 300,26 mg/mmol  
= 45,0 mg

Rendemen =  $\frac{\text{massa hasil sintesis}}{\text{massa teoritis}} \times 100\%$   
=  $\frac{28,3 \text{ mg}}{45,0 \text{ mg}} \times 100\% = 62,88\%$

Lanjutan perhitungan rendemen hasil reaksi sintesis senyawa [A] dan [B]

2. b. Sintesis senyawa 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-asam karboksilat [B] dengan perbandingan sulokrin:KOH=1:2

Sulokrin (BM 332,30 mg/mmol) : 50,0 mg = 0,15 mmol  
KOH (BM 56 mg/mmol) : 16,8 mg = 0,30 mmol  
Senyawa [B] (BM 286,24 mg/mmol) Hasil sintesis diperoleh 15,4 mg

	Sulokrin	+	KOH	→	senyawa [B]
Mula-mula :	0,15 mmol		0,30 mmol		
Reaksi :	0,15 mmol		0,15 mmol		0,15 mmol
Sisa	—		0,15 mmol		0,15 mmol

Produk secara teoritis = jumlah mol produk x BM produk  
= 0,15 mmol x 286,24 mg/mmol  
= 42,9 mg

Rendemen =  $\frac{\text{massa hasil sintesis}}{\text{massa teoritis}} \times 100\%$   
=  $\frac{15,4 \text{ mg}}{42,9 \text{ mg}} \times 100\% = 35,89\%$



Lanjutan perhitungan rendemen hasil reaksi sintesis senyawa [A] dan [B]

3. a. Sintesis senyawa metil 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-karboksilat [A] dengan perbandingan sulokrin : KOH = 1 : 3

Sulokrin (BM 332,30 mg/mmol) : 50,0 mg = 0,15 mmol

KOH (BM 56 mg/mmol) : 25,3 mg = 0,45 mmol

Senyawa [A] (BM 300,26 mg/mmol) Hasil sintesis diperoleh 25,2 mg

	Sulokrin	+	KOH	→	senyawa [A]
Mula-mula :	0,15 mmol		0,45 mmol		
Reaksi :	0,15 mmol		0,15 mmol		0,15 mmol
Sisa	—		0,30 mmol		0,15 mmol

Produk secara teoritis = jumlah mol produk x BM produk  
= 0,15 mmol x 300,26 mg/mmol  
= 45,0 mg

Rendemen =  $\frac{\text{massa hasil sintesis}}{\text{massa teoritis}} \times 100\%$

=  $\frac{25,2 \text{ mg}}{45,0 \text{ mg}} \times 100\% = 56,00\%$

Lanjutan perhitungan rendemen hasil reaksi sintesis senyawa [A] dan [B]

3. b. Sintesis senyawa 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-asam karboksilat [B] dengan perbandingan sulokrin:KOH=1:3

Sulokrin (BM 332,30 mg/mmol) : 50,0 mg = 0,15 mmol  
KOH (BM 56 mg/mmol) : 25,3 mg = 0,45 mmol  
Senyawa [B] (BM 286,24 mg/mmol) Hasil sintesis diperoleh 16,2 mg

	Sulokrin	+	KOH	→	senyawa [B]
Mula-mula :	0,15 mmol		0,45 mmol		
Reaksi :	0,15 mmol		0,15 mmol		0,15 mmol
Sisa	—		0,30 mmol		0,15 mmol

Produk secara teoritis = jumlah mol produk x BM produk  
= 0,15 mmol x 286,24 mg/mmol  
= 42,9 mg

Rendemen =  $\frac{\text{massa hasil sintesis}}{\text{massa teoritis}} \times 100\%$   
=  $\frac{16,2 \text{ mg}}{42,9 \text{ mg}} \times 100\% = 37,76\%$

Lanjutan perhitungan rendemen hasil reaksi sintesis senyawa [A] dan [B]

4. a. Sintesis senyawa metil 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-karboksilat [A] dengan perbandingan sulokrin:KOH = 1 : 4

Sulokrin (BM 332,30 mg/mmol) : 50,2 mg = 0,15 mmol  
KOH (BM 56 mg/mmol) : 33,7 mg = 0,60 mmol  
Senyawa [A] (BM 300,26 mg/mmol) Hasil sintesis diperoleh 25,6 mg

	Sulokrin	+	KOH	→	senyawa [A]
Mula-mula :	0,15 mmol		0,60 mmol		
Reaksi :	0,15 mmol		0,15 mmol		0,15 mmol
Sisa	—		0,45 mmol		0,15 mmol

Produk secara teoritis = jumlah mol produk x BM produk  
= 0,15 mmol x 300,26 mg/mmol  
= 45,0 mg

Rendemen =  $\frac{\text{massa hasil sintesis}}{\text{massa teoritis}} \times 100\%$   
=  $\frac{25,6 \text{ mg}}{45,0 \text{ mg}} \times 100\% = 56,88\%$

Lanjutan perhitungan rendemen hasil reaksi sintesis senyawa [A] dan [B]

4. b. Sintesis senyawa 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-asam karboksilat [B] dengan perbandingan sulokrin:KOH=1:4

Sulokrin (BM 332,30 mg/mmol) : 50,0 mg = 0,15 mmol

KOH (BM 56 mg/mmol) : 33,7 mg = 0,60 mmol

Senyawa [B] (BM 286,24 mg/mmol) Hasil sintesis diperoleh 16,5 mg

	Sulokrin	+	KOH	→	senyawa [B]
Mula-mula :	0,15 mmol		0,60 mmol		
Reaksi :	0,15 mmol		0,15 mmol		0,15 mmol
Sisa	—		0,45 mmol		0,15 mmol

Produk secara teoritis = jumlah mol produk x BM produk  
= 0,15 mmol x 286,24 mg/mmol  
= 42,9 mg

Rendemen =  $\frac{\text{massa hasil sintesis}}{\text{massa teoritis}} \times 100\%$

=  $\frac{25,6 \text{ mg}}{45,0 \text{ mg}} \times 100\% = 38,46\%$

Lanjutan perhitungan rendemen hasil reaksi sintesis senyawa [A] dan [B]

5. a. Sintesis senyawa metil 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-karboksilat [A] dengan perbandingan sulokrin:KOH = 1 : 5

Sulokrin (BM 332,30 mg/mmol) : 50,2 mg = 0,15 mmol  
KOH (BM 56 mg/mmol) : 43,2 mg = 0,77 mmol  
Senyawa [A] (BM 300,26 mg/mmol) Hasil sintesis diperoleh 24,0 mg

	Sulokrin	+	KOH	→	senyawa [A]
Mula-mula :	0,15 mmol		0,77 mmol		
Reaksi :	0,15 mmol		0,15 mmol		0,15 mmol
Sisa	—		0,62 mmol		0,15 mmol

Produk secara teoritis = jumlah mol produk x BM produk  
= 0,15 mmol x 300,26 mg/mmol  
= 45,0 mg

Rendemen =  $\frac{\text{massa hasil sintesis}}{\text{massa teoritis}} \times 100\%$   
=  $\frac{24,0 \text{ mg}}{45,0 \text{ mg}} \times 100\% = 53,33\%$

Lanjutan perhitungan rendemen hasil reaksi sintesis senyawa [A] dan [B]

5. b. Sintesis senyawa 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-asam karboksilat [B] dengan perbandingan sulokrin:KOH=1:5

Sulokrin (BM 332,30 mg/mmol) : 50,0 mg = 0,15 mmol

KOH (BM 56 mg/mmol) : 43,2 mg = 0,77 mmol

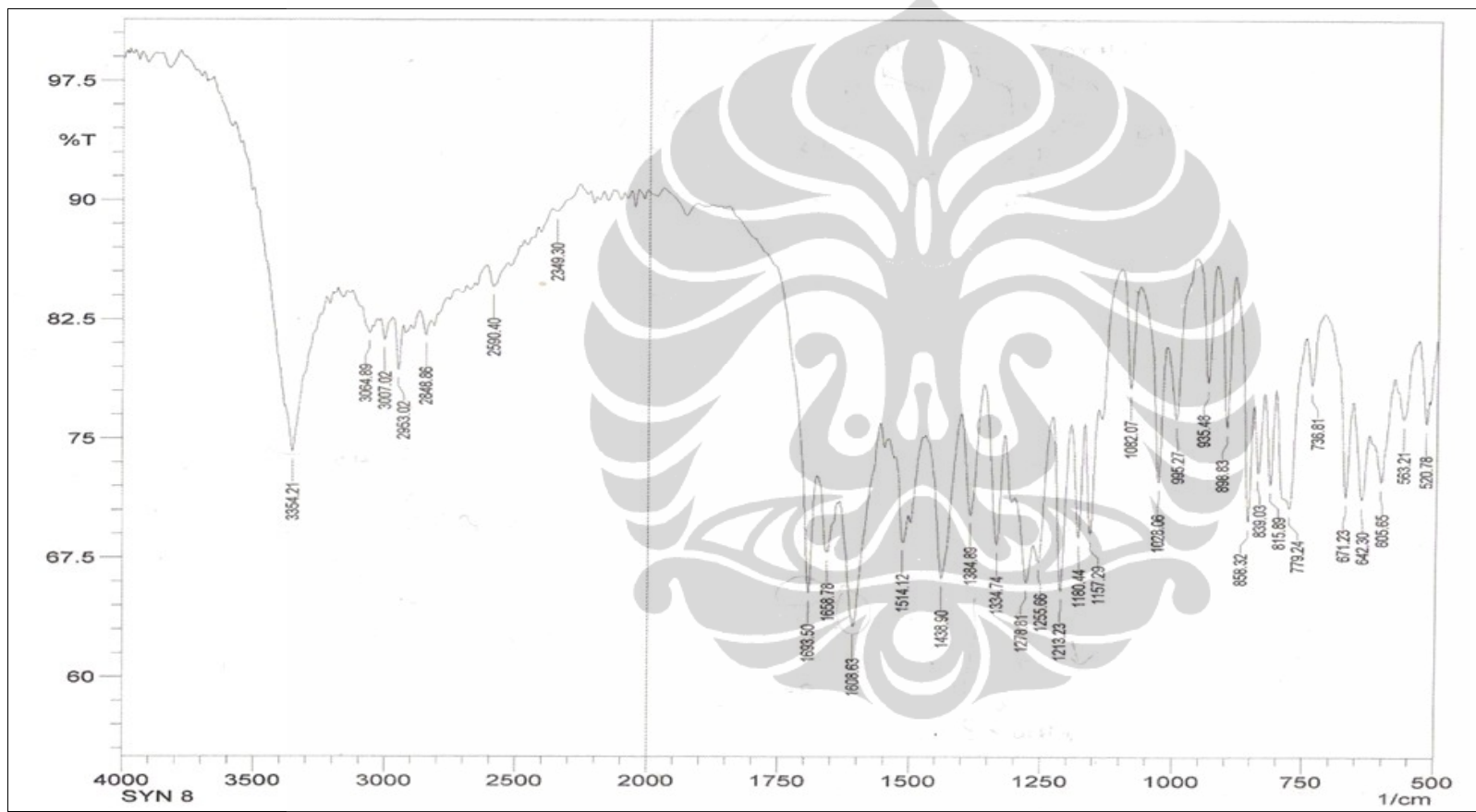
Senyawa [B] (BM 286,24 mg/mmol) Hasil sintesis diperoleh 17,3 mg

	Sulokrin	+	KOH	→	senyawa [B]
Mula-mula :	0,15 mmol		0,77 mmol		
Reaksi :	0,15 mmol		0,15 mmol		0,15 mmol
Sisa	—		0,62 mmol		0,15 mmol

Produk secara teoritis = jumlah mol produk x BM produk  
= 0,15 mmol x 286,24 mg/mmol  
= 42,9 mg

Rendemen =  $\frac{\text{massa hasil sintesis}}{\text{massa teoritis}} \times 100\%$   
=  $\frac{17,3 \text{ mg}}{42,9 \text{ mg}} \times 100\% = 40,32\%$

Lampiran 3. Spektrum FT-IR senyawa metil 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-karboksilat [A]

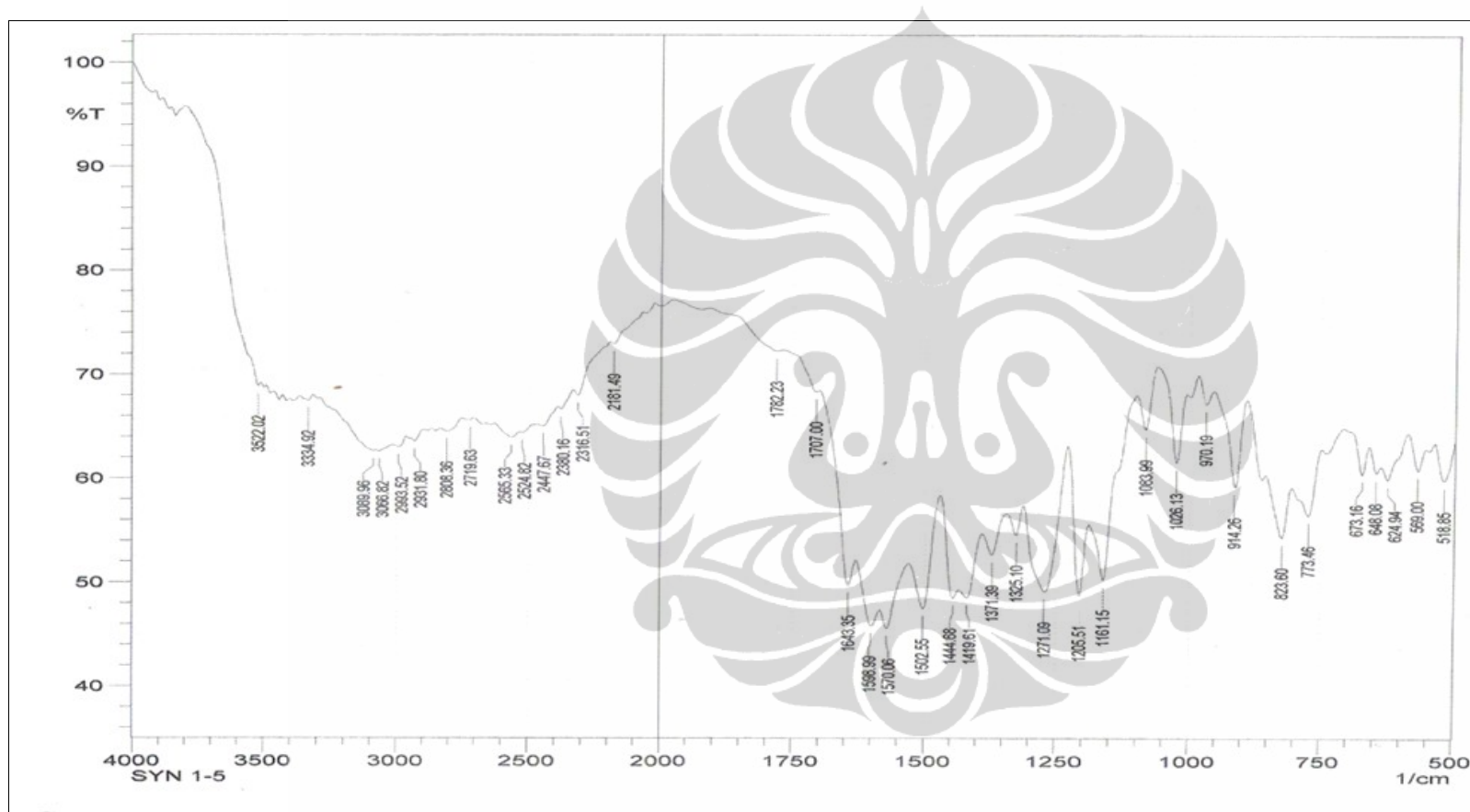


Comment :  
Senyawa [A]

Date/Time: 08/09/2010 10:45:39 AM

Universitas Indonesia

Lampiran 4. Spektrum FT-IR asam 3,8-dihidroksi-6-metil-9-oxo-9H-xanthen-1-karboksilat [B]



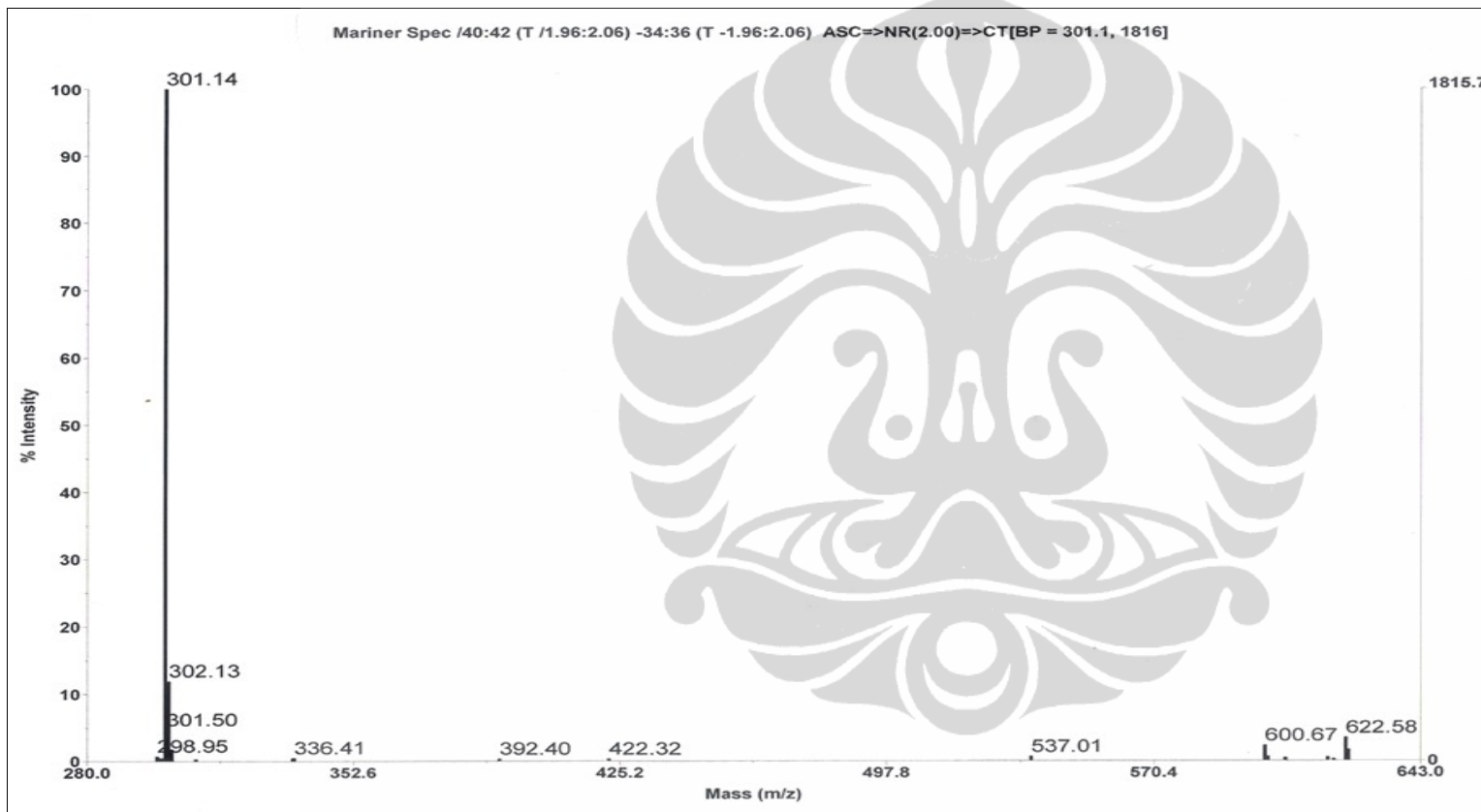
Comment :  
Senyawa [B]

Date/Time: 05/11/2010 03:53:31 AM

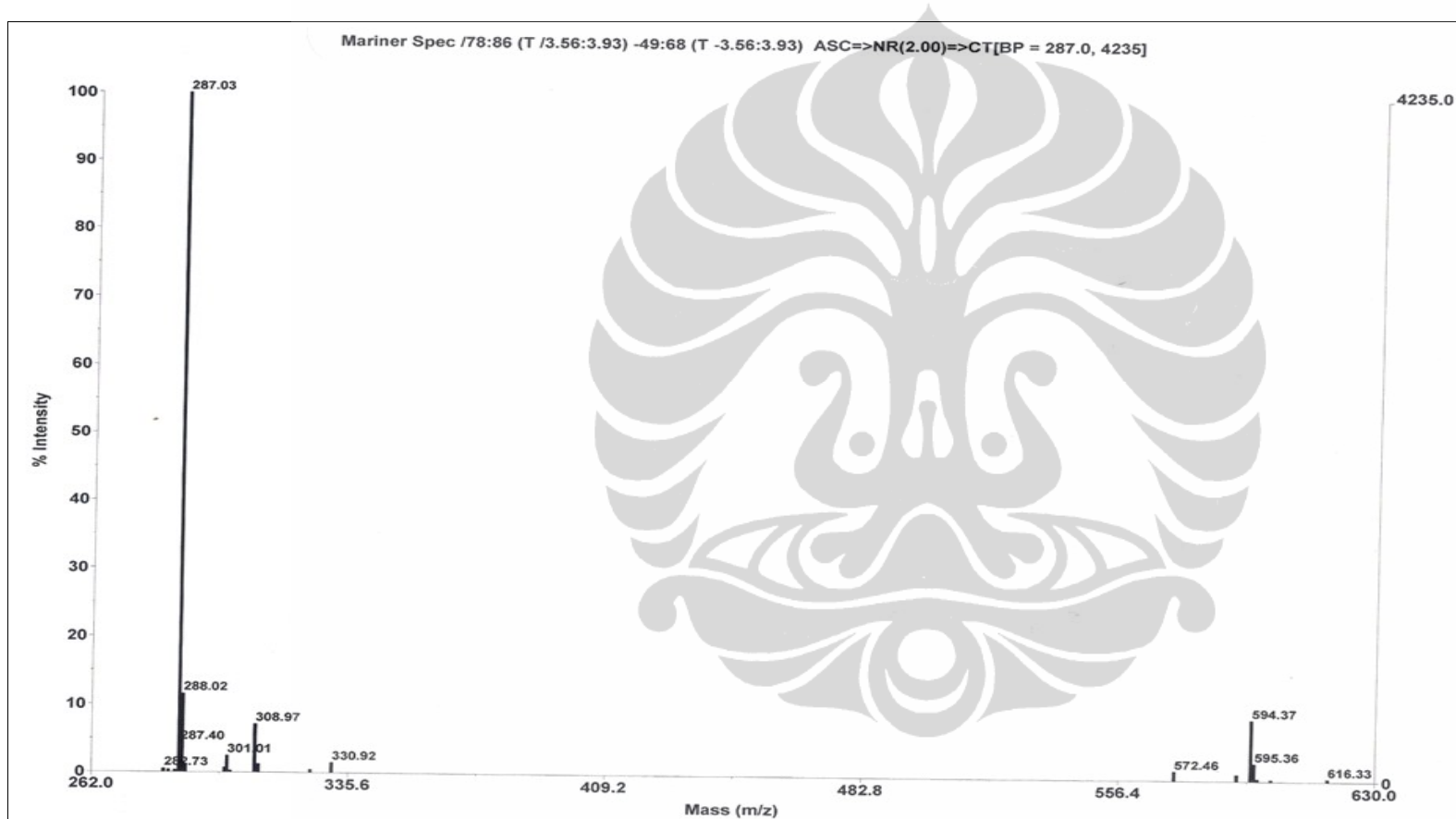
Universitas Indonesia



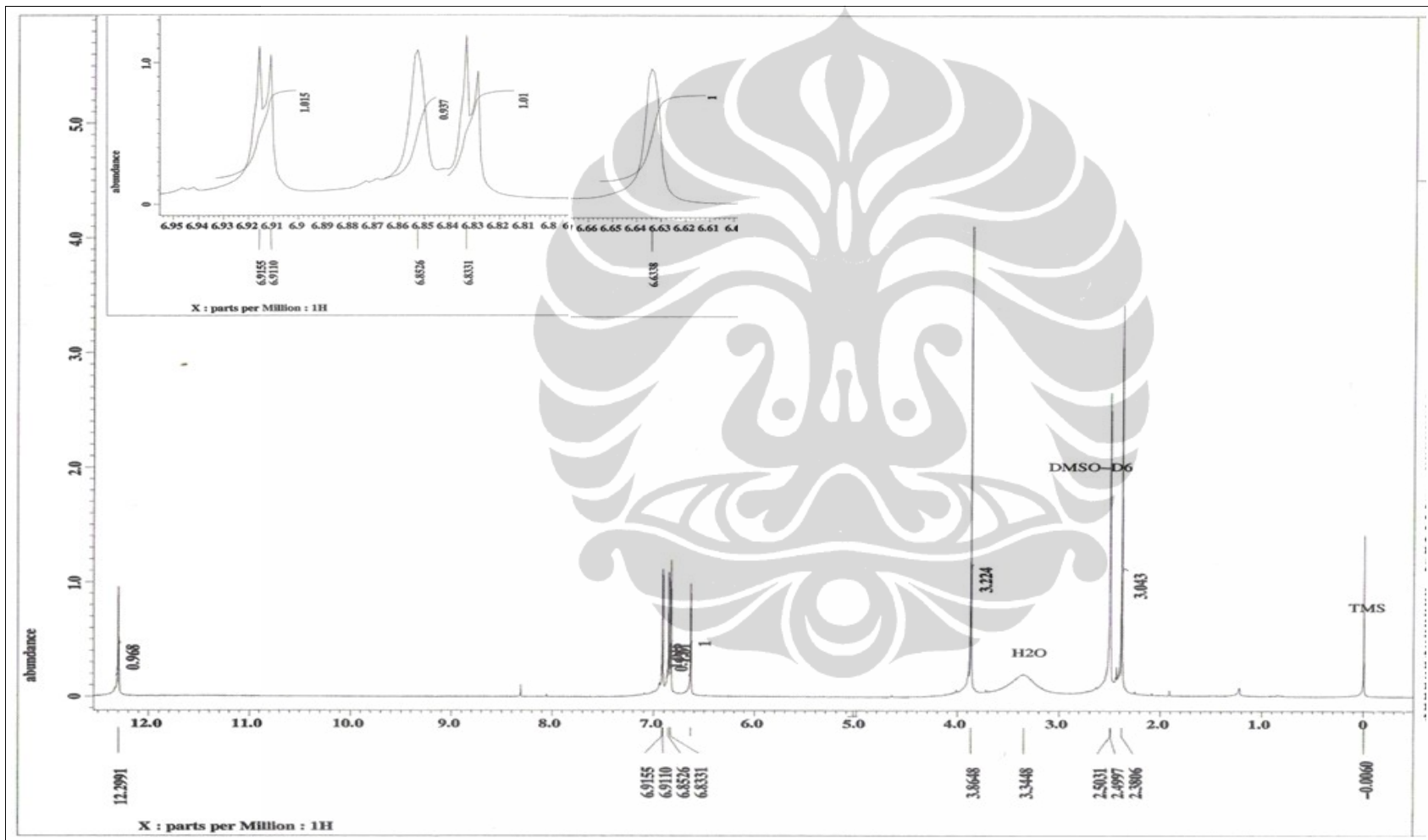
Lampiran 5. Spektrum LC-MS senyawa [A]



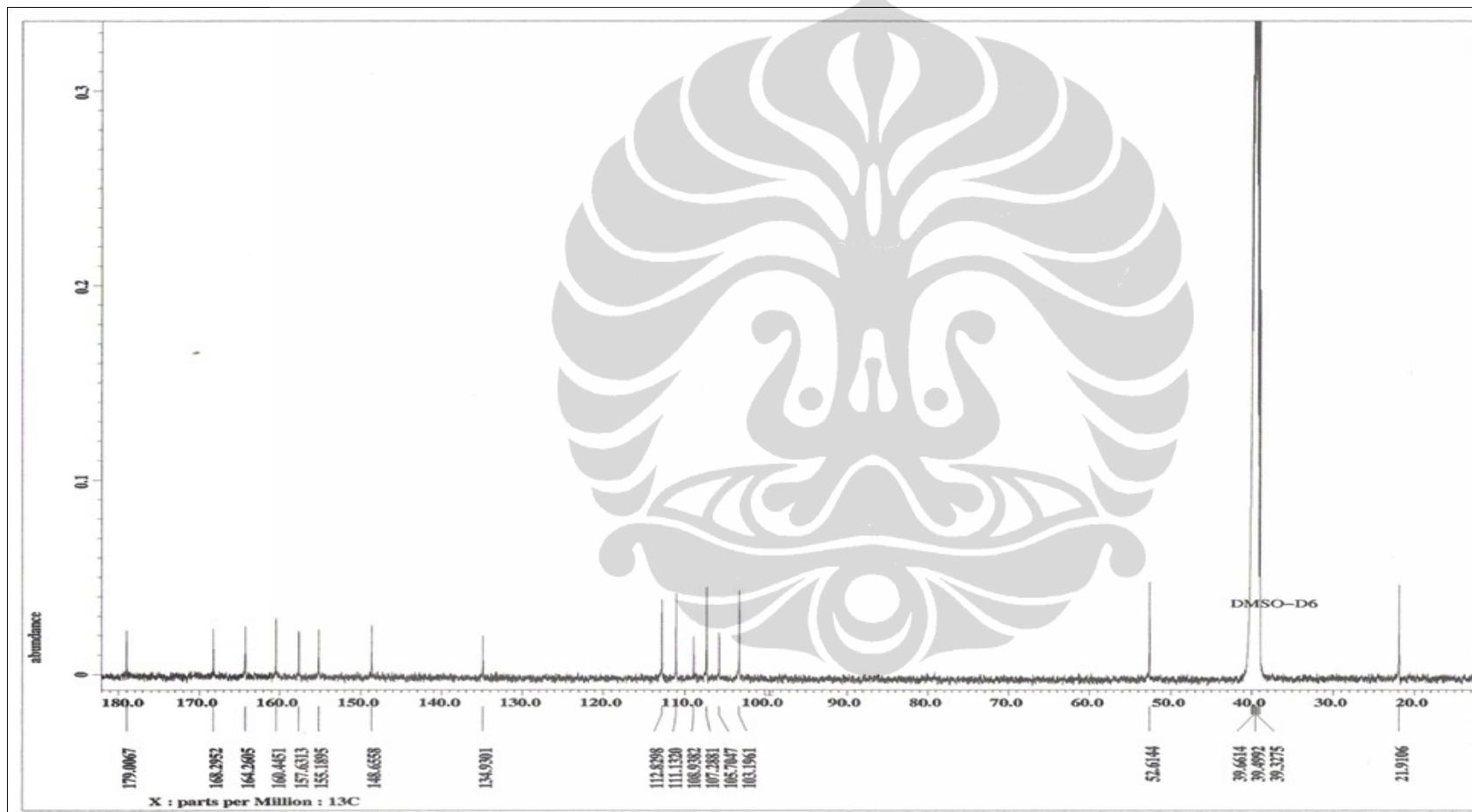
Lampiran 6. Spektrum LC-MS senyawa [B]



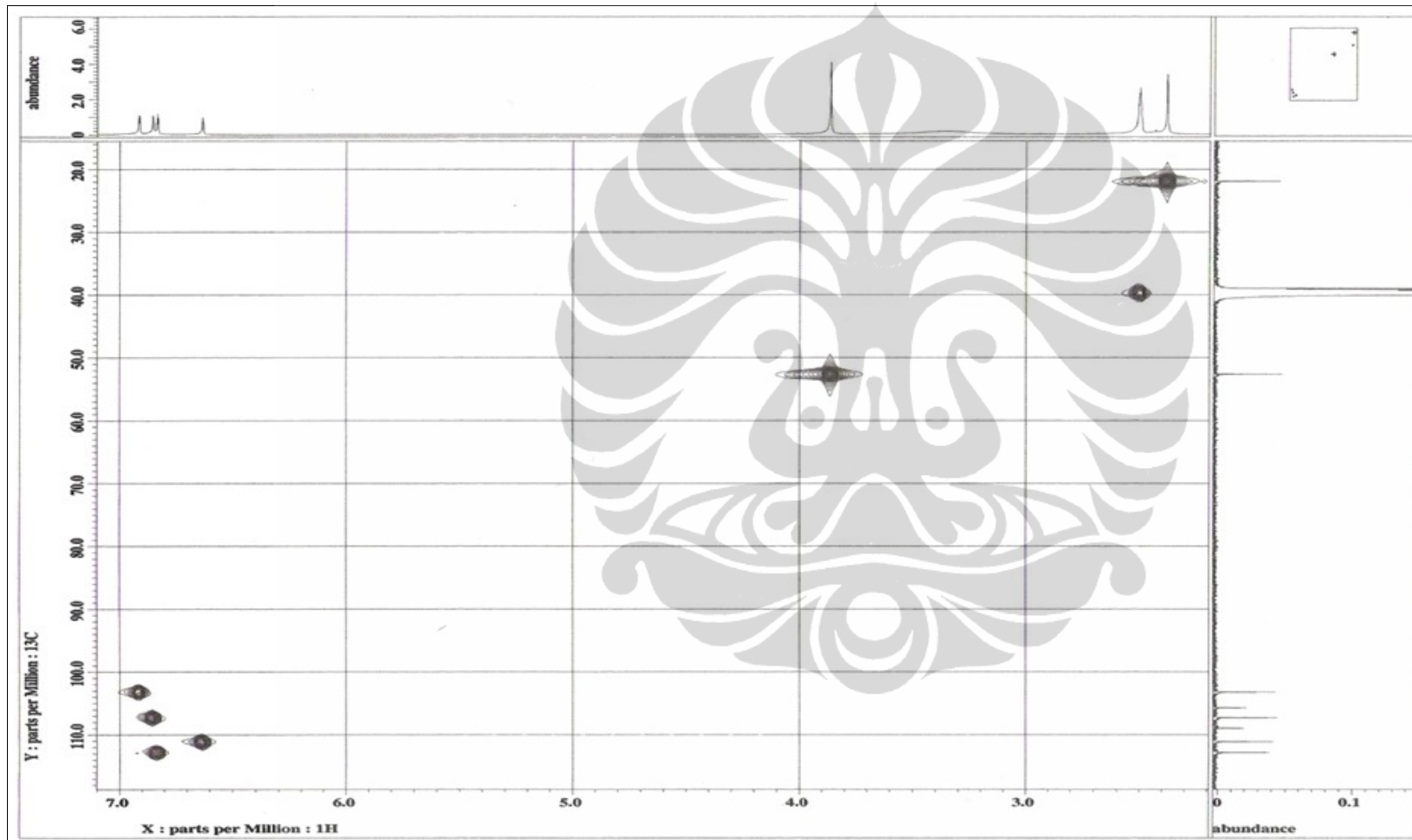
Lampiran 7. Spektrum  $^1\text{H-NMR}$  Senyawa [A]



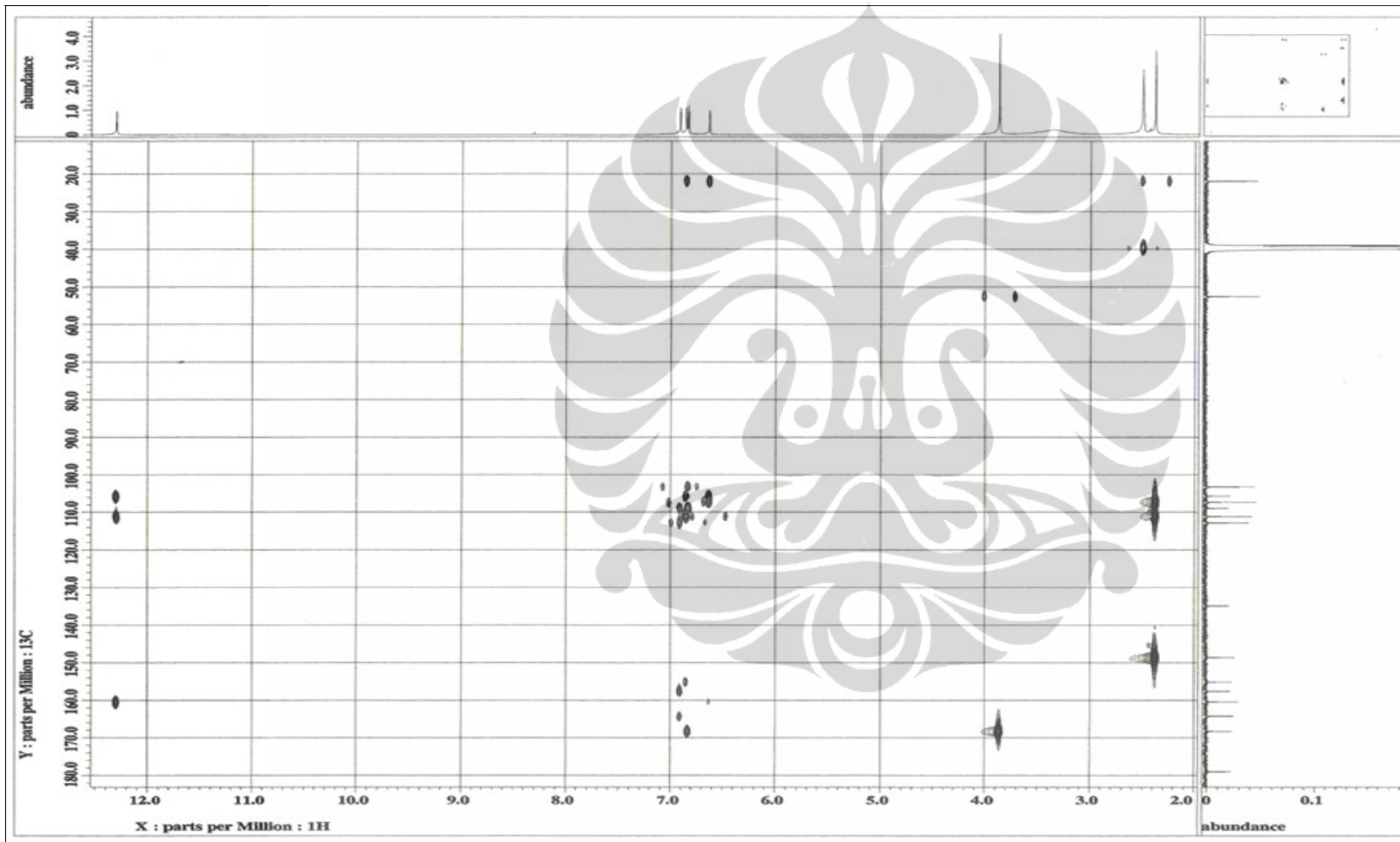
Lanjutan Spektrum  $^{13}\text{C}$ -NMR Senyawa [A]



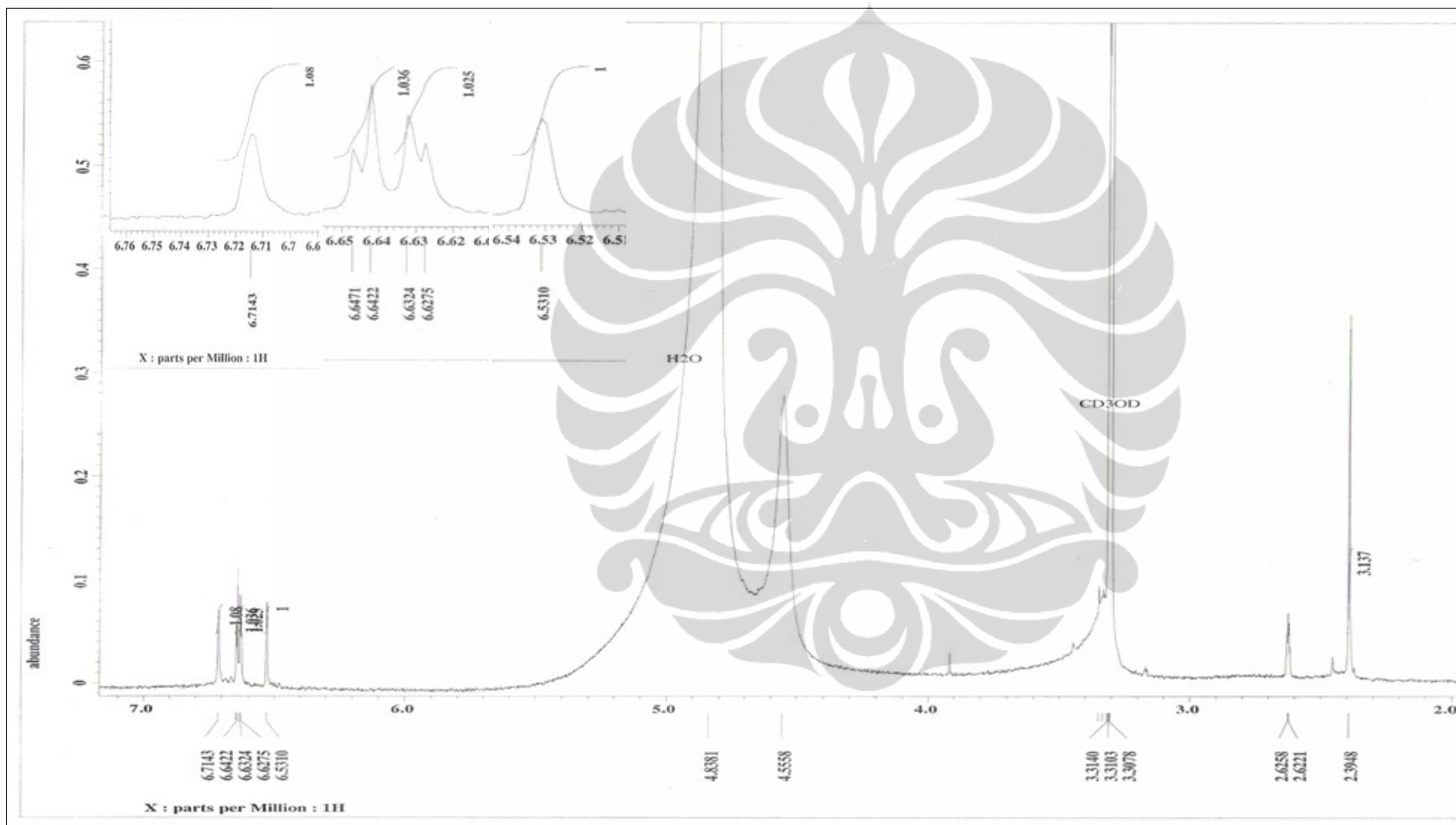
Lanjutan Spektrum HMQC senyawa [A]



Lanjutan Spektrum HMBC senyawa [A]

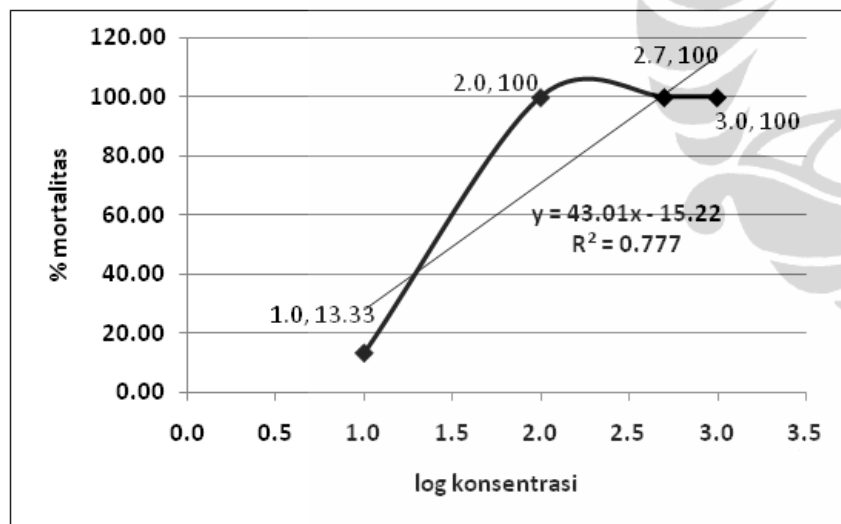


### Lampiran 8. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ Senyawa [B]



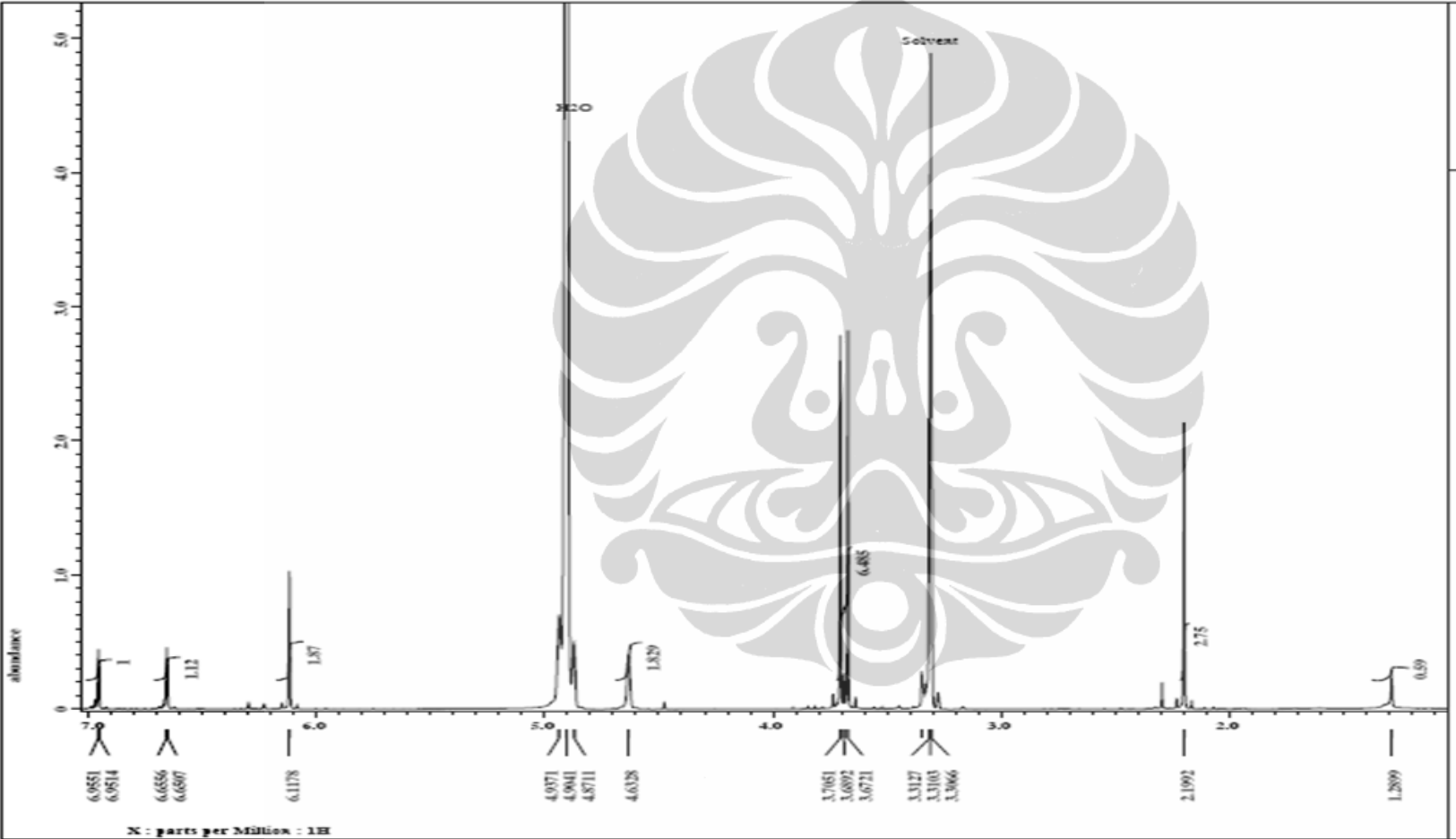
**Lampiran 9. Data Hasil Uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dan Kurva Linear Korelasi antara Log Konsentrasi dengan Persen Mortalitas Larva *A. salina* Leach terhadap Senyawa [A]**

Konsentrasi (K), ppm	Log K	Larva Hidup						Mati	Hidup	Akumulasi mati	Akumulasi hidup	% Mortalitas	Log K	LC50 K (ppm)
		awal			akhir									
10	1,0	10	10	10	8	8	10	4	26	4	26	13,33	1516	32,80
100	2,0	10	10	10	0	0	0	30	0	34	0	100,00		
500	2,7	10	10	10	0	0	0	30	0	64	0	100,00		
1000	3,0	10	10	10	0	0	0	30	0	94	0	100,00		

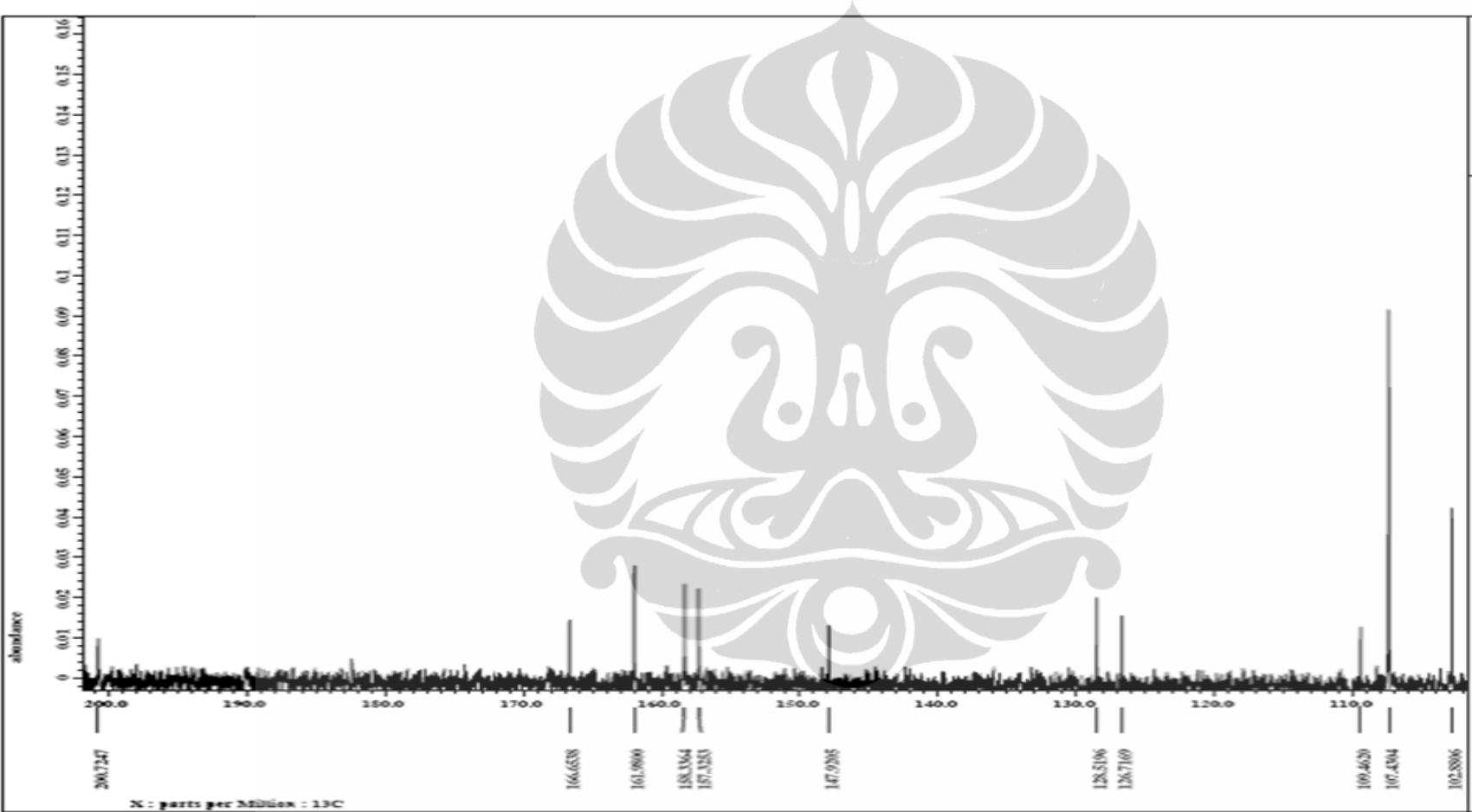




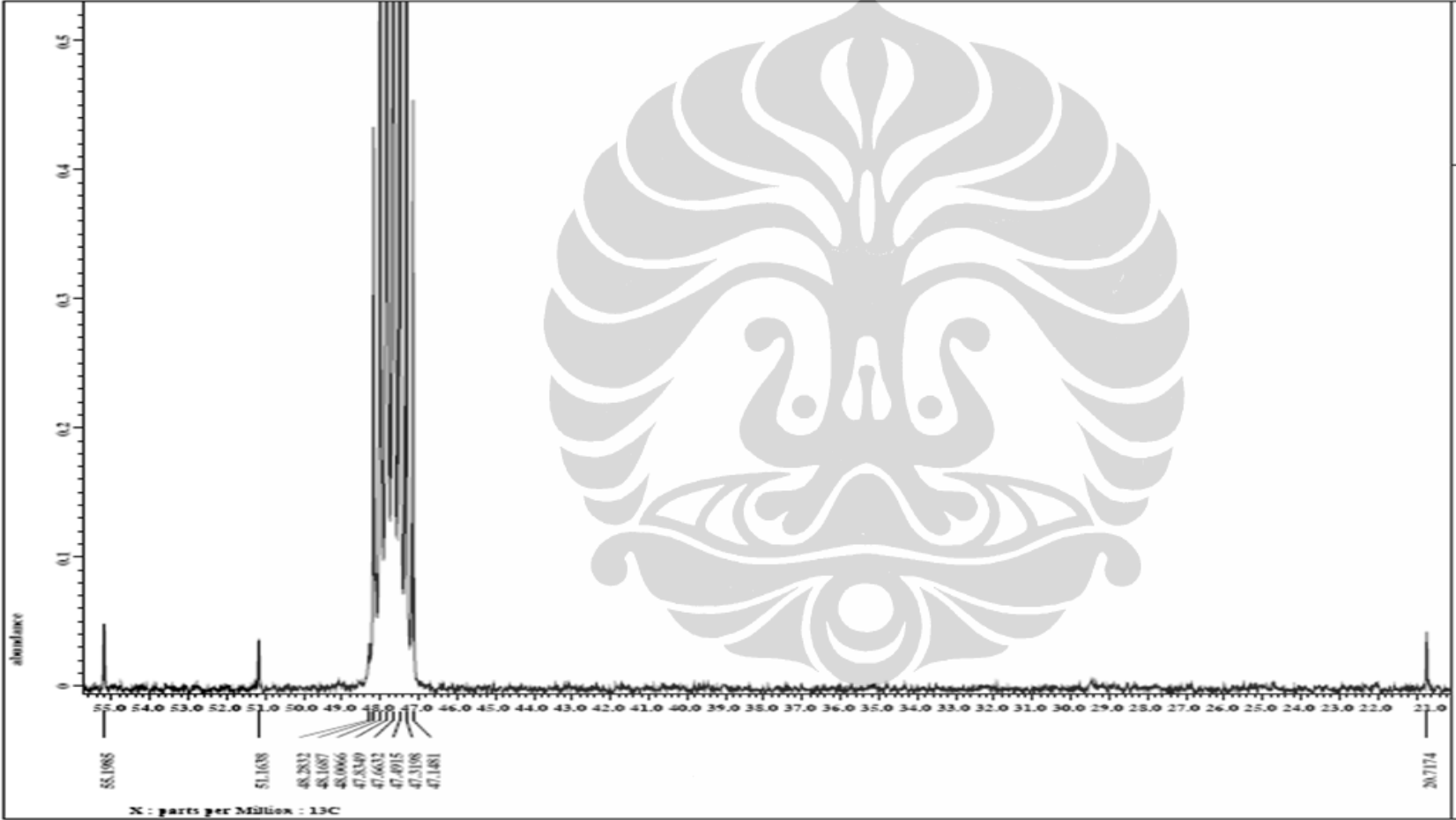
Lampiran 10. Spektrum <sup>1</sup>H-NMR Senyawa Sulokrin



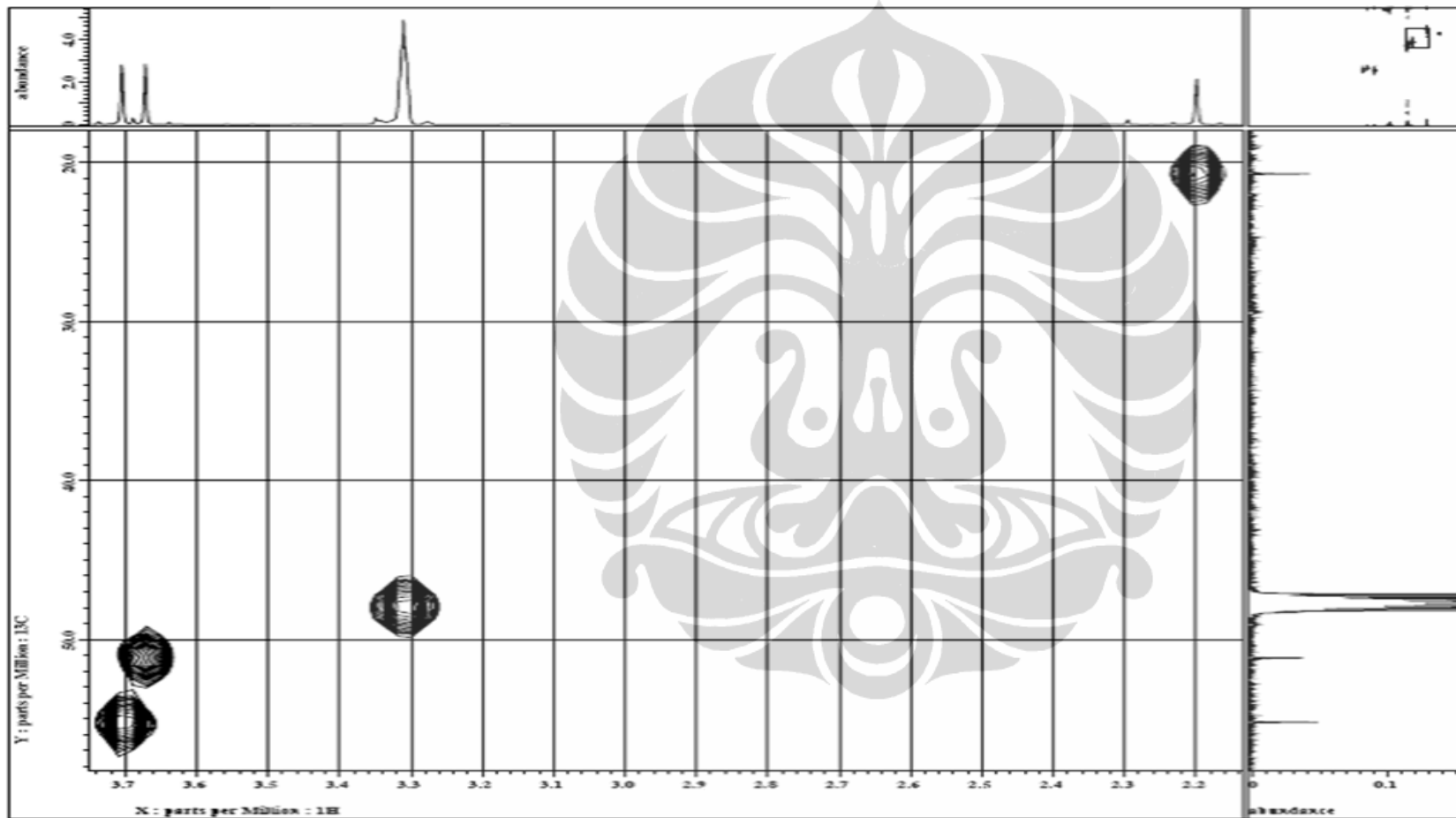
Lanjutan Spektrum  $^{13}\text{C}$ -NMR Senyawa Sulokrin



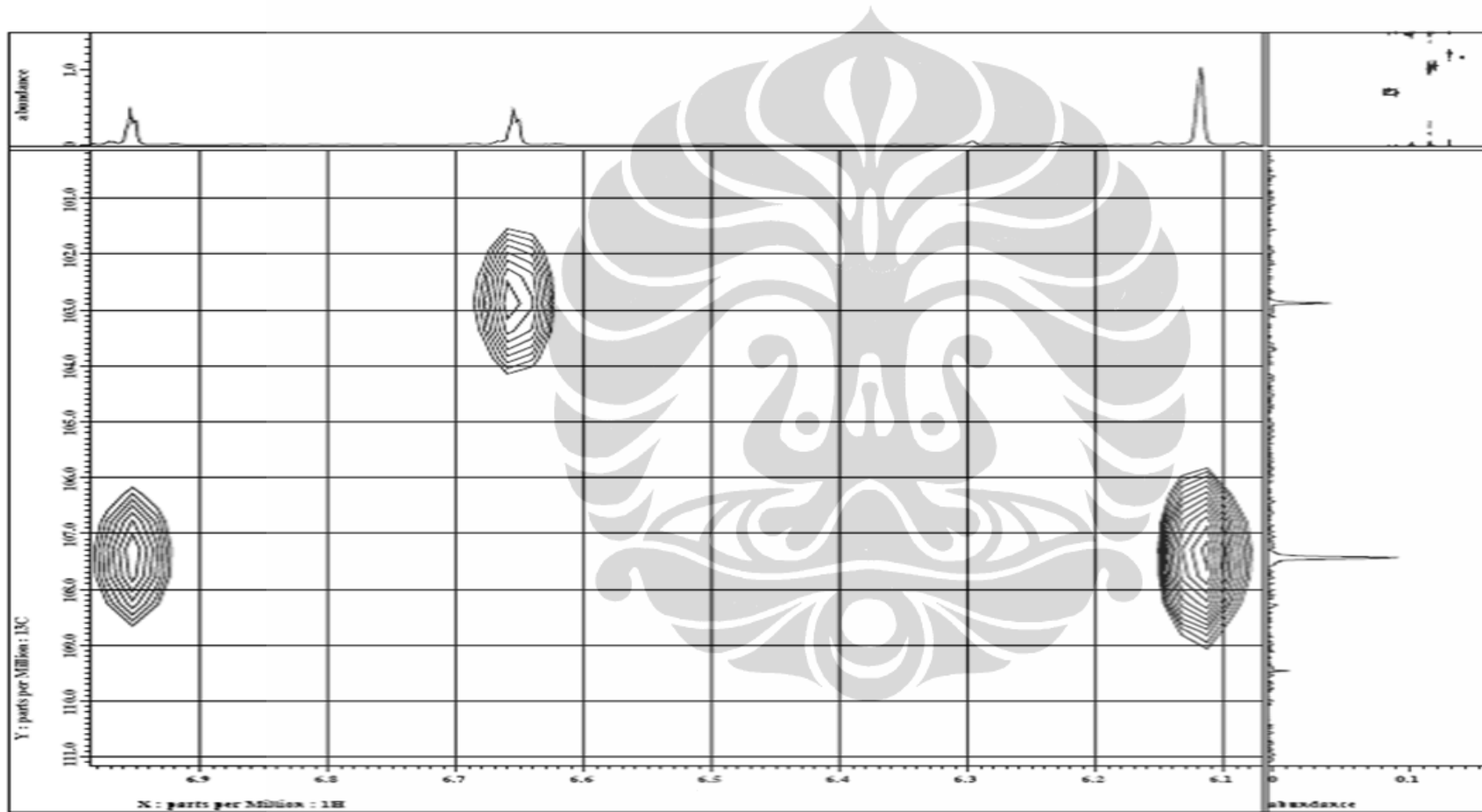
Lanjutan Spektrum <sup>13</sup>C-NMR Senyawa Sulokrin



Lanjutan Spektrum HMQC Senyawa Sulokrin



Lanjutan Spektrum HMQC Senyawa Sulokrin



Lanjutan Spektrum HMBC Senyawa Sulokrin

