

SENYAWA SITOTOKSIK DARI FRAKSI ETIL ASETAT BUAH *Brucea javanica* (L.) Merr TERHADAP SEL HeLa

(CYTOTOXIC COMPOUND FROM ETHYL ACETATE FRACTION OF *Brucea javanica* (L.) Merr FRUIT AGAINST HeLa CELL LINE)

Nurlina^{*}, Ari Widiyantoro

Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Tanjungpura, Jl. Prof. Dr. Hadari Nawawi Pontianak
78124 Telp. (0561) 585343

* email: nurlinanyayani@gmail.com

Received 14 September 2014, Accepted 12 February 2015, Published 01 March 2015

ABSTRAK

Isolat relatif murni sebanyak 85 mg telah diisolasi dari 4,5 kg sampel buah *Brucea javanica* (L.) Merr. Isolat diperoleh dari fraksi etil asetat buah *B. javanica* (L.) Merr. Isolat berupa padatan amorf berwarna merah kecoklatan dengan titik leleh 202-206 °C. Uji fitokimia isolat memberikan hasil positif untuk golongan terpenoid. Berdasarkan analisis spektroskopi UV, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR dan perbandingan dengan data senyawa yang telah diketahui, isolat merupakan senyawa quassinoid dengan nama Picras 3-en-21- asam oat, 15-(asetiloksi)-13,20-epoksi-3-(β-D-glukopiranosiloksi)-11,12-dihidroksi-2,16-diokso-metil ester. Uji sitotoksik menggunakan metode MTT menunjukkan senyawa tersebut mempunyai IC₅₀ 9,7 µg/mL.

Kata Kunci : senyawa sitotoksik, sel HeLa, buah *Brucea javanica* (L.) Merr

ABSTRACT

The pure compound relatively (85 mg) was isolated from 4.5 kg *Brucea javanica* (L.) Merr. fruits sample. It was obtained from ethyl acetate fraction as a red-brownish amorphous solid of melting point 202-206 °C. Phytochemical screening of isolate showed positive result of terpenoid group. Based on analysis by UV, IR, ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectroscopy and by comparison with known related compounds, indicated that isolate is quassinoid compound named Picras 3- en- 21- oat acid, 15-(acetyloxy)-13,20- epoxy-3-(β-D- glucopyranosyloxy)-11, 12- dihydroxy -2, 16- dioxo -, methyl ester. Cytotoxic test using MTT assay method showed that compound have IC₅₀ 9,7 µg/mL.

Keywords: cytotoxic compound, HeLa cell line, *Brucea javanica* (L.) Merr fruit

PENDAHULUAN

Brucea javanica (L.) Merr. merupakan salah satu tumbuhan dari famili Simaroubaceae yang banyak terdapat di hutan Kalimantan Barat. Tumbuhan yang juga dikenal dengan nama Buah Makasar ini, merupakan tumbuhan obat dan telah dimanfaatkan secara tradisional oleh masyarakat. Bagian yang umumnya digunakan adalah buahnya.

Buahnya dapat dimanfaatkan untuk mengobati demam, malaria, disentri, dan diare kronis akibat terinfeksi *Trichomonas* sp (Kitagawa *et al.*, 1994).

Berdasarkan literatur, penelitian aktivitas farmakologi *B. javanica* (L.) Merr. yang telah dilakukan antara lain ekstrak kloroform *B. javanica* (L.) Merr. memiliki potensi sitotoksik dalam melawan sel leukimia melalui mekanisme inhibisi *NF-κB p65* (Kim *et al.*, 2010). Ekstrak daun *B. javanica* (L.) Merr. yang mengandung flavonoid memiliki kemampuan menginduksi apoptosis beberapa jenis sel kanker melalui peningkatan ekspresi protein bax, p53 and caspase-3 protein (Ismail *et al.*, 2012). Ekstrak air buah *B. javanica* (L.) Merr. memberikan efek farmakologi sebagai antikanker (Lau *et al.*, 2005). Fraksi *n*-heksan dari buah *B. javanica* (L.) Merr. terbukti sebagai antihipertensi (Roswiem dkk., 2012). Brusatol, salah satu jenis quassinoid yang berhasil diekstrak dari *B. javanica* menunjukkan potensi sitotoksik dan aktivitas *antifeedant* larva *Spodoptera exigua* (Zhang *et al.*, 2013). Kajian secara kimiawi menunjukkan adanya keterkaitan antara efek farmakologi yang ditimbulkan oleh ekstrak biji dan buah *B. javanica* (L.) Merr. dengan struktur senyawa kimia yang terdapat dalamnya, yang meliputi senyawa quassinoid, alkaloid dan terpenoid (Su *et al.*, 2002).

Quassinoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang umumnya ditemukan pada famili Simaroubaceae. Secara kimia, senyawa ini merupakan turunan dari triterpen. Quassinoid adalah senyawa lakton teroksigenasi dan umumnya memiliki kerangka dasar C-20 yang disebut *picrasane*. Selain itu terdapat pula quassinoid dengan kerangka dasar C-18, C-19 dan C-25 (Guo *et al.*, 2005). Pada bagian biji *B. javanica* (L.) Merr. telah berhasil diisolasi beberapa quassinoid (Sakaki *et al.*, 1986; Kim *et al.*, 2004^a; Kim *et al.*, 2004^b). Senyawa quassinoid dari buah *B. javanica* (L.) Merr. juga telah berhasil diisolasi, antara lain dari fraksi kloroform dan fraksi *n*-butanol buah *B. javanica* (L.) Merr (O' Neill *et al.*, 1987).

Fraksi-fraksi lain dari buah *B. javanica* (L.) Merr juga berpotensi untuk diteliti keterkaitan efek farmakologi dengan struktur senyawa kimianya. Berdasarkan uji aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa yang dilakukan pada fraksi *n*-heksana, fraksi metilen klorida, fraksi etil asetat, dan fraksi metanol buah *B. javanica* (L.) Merr, diketahui bahwa fraksi-fraksi tersebut memiliki IC₅₀ yaitu 56,7; 12,8; 10,8; 17,9 µg/mL. Fraksi etil asetat memiliki aktivitas yang lebih baik dibandingkan fraksi-fraksi yang lain. Penelitian ini merupakan langkah awal untuk menelusuri karakteristik senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam fraksi etil asetat *B. javanica* (L.) Merr yang bersifat sitotoksik terhadap sel Hela.

METODE PENELITIAN

Sampel yang digunakan adalah bagian buah dari *B. javanica* (L.) Merr. Sampel *B. javanica* (L.) Merr. yang diperoleh dari hutan Taman Nasional Gunung Palung, Kalimantan Barat. Keakuratan spesies dideterminasi di Herbarium Bogoriense Balitbang Botani-Puslitbang Biologi LIPI Bogor.

Bahan-bahan yang digunakan adalah berbagai jenis pelarut organik diantaranya metanol (teknis dan p.a), *n*-heksana (teknis), metilen klorida (teknis), etil asetat (teknis), kloroform (p.a), berbagai pereaksi dalam penapisan fitokimia meliputi asam sulfat (H₂SO₄) 2N, asam klorida (HCl) 2N, reagen Liebermann-Burchard, silika gel G-60 70-230 mesh untuk kromatografi kolom, serta plat kromatografi lapis tipis silika gel 60 F₂₅₄.

Bahan untuk preparasi sampel uji sitotoksik adalah dimetilsulfoksida (DMSO) 100 % prokultur dan media kultur *Rosewell Park Memorial Institute* (MK RPMI) 1640 (Gibco). Spesimen uji digunakan adalah sel HeLa koleksi Laboratorium Ilmu Hayati UGM. Bahan untuk pekerjaan kultur sel adalah MK RPMI 1640, *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10 % v/v (Gibco), penisilin-streptomisin 1 % v/v (Sigma), dan fungizon 0,5 % v/v (Sigma) dalam MK RPMI 1640. *Phosphate buffer saline* (PBS) 1x. Bahan untuk uji sitotoksitas adalah MK RPMI 1640, PBS 1x, reagen 3-(4,5-dimetil tiazol- 2-il (-2,5-difenil tetrazolium bromida)) (MTT) (Sigma) 5 mg dalam 1 mL PBS 1x (Sigma) dan ditambahkan MK RPMI 1640 hingga 10 mL, dan reagen stopper SDS 10% (Sigma) dalam HCl 0,01 N (Merck). Bahan untuk uji apoptosis adalah MK RPMI 1640, PBS 1x, 100 µg/mL akridin oranye (bio-Rad) dalam PBS 1x dan 100 µg/mL etidium bromida (bio-Rad) dalam PBS 1x.

Alat-alat yang digunakan diantaranya adalah alat-alat gelas kimia yang umum digunakan di Laboratorium Kimia Organik, neraca analitik (Mettler AE 2000), seperangkat alat kromatografi kolom, evaporator yang dilengkapi dengan sistem vakum (*rotary Heidolph WB 2000*), lampu UV (Vettler GMBH), *melting point* (SMP 10 Stuart Scientific), spektrofotometer ultraungu-tampak (Varian Cary conc.), spektrofotometer inframerah (FTIR) (Shimadzu), spektrometer resonansi magnet inti proton (¹H-NMR) (Unity Plus Variant-500 MHz), spektrometer resonansi magnet inti karbon (¹³C-NMR) (Jeol JNM PNX-125 MHz) dan ELISA reader.

Prosedur

Sebanyak 4,50 kg sampel buah *B. javanica* (L.) Merr. yang telah dihaluskan diekstraksi dengan metanol pada suhu kamar. Ekstrak kental metanol (297,57 g) kemudian dipartisi menggunakan beberapa pelarut organik dengan tingkat kepolaran berbeda, yaitu *n*-heksana, metilen klorida, etil asetat, dan metanol. Hasil partisi dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* sehingga dihasilkan fraksi *n*-heksana (36,89 g), fraksi metilen klorida (30,07 g), fraksi etil asetat (7,78 g), dan fraksi metanol (32,55 g). Fraksi yang akan diteruskan selanjutnya adalah fraksi etil asetat.

Pemisahan dan pemurnian fraksi etil asetat dilanjutkan dengan Kromatografi Vakum Cair (KVC) menggunakan variasi eluen metilen klorida:etil asetat (2:1), metilen klorida:etil asetat (1:1), metilen klorida:etil asetat (1:2), etil asetat 100 % dan metanol 100 %. Fraksi hasil pemisahan ditampung setiap 30 mL, sehingga diperoleh 53 fraksi. Hasil KVC adalah enam fraksi gabungan, yaitu fraksi A-F. Fraksi E (2,62 g, berwarna merah kecoklatan) dilanjutkan pada tahap Kromatografi Kolom Gravitasi I (KKG I) menggunakan variasi eluen metilen klorida:etil asetat 4:1, metilen klorida:etil asetat 2:1, metilen klorida:etil asetat 1:4, metilen klorida:etil asetat 1:8, etil asetat 100 %, etil asetat:metanol 8:1, etil asetat:metanol 4:1, etil asetat:metanol 1:1, etil asetat:metanol 1:2, etil asetat:metanol 1:4, etil asetat:metanol 1:8, etil asetat:metanol 1:10, metanol 100 %. Fraksi hasil KKG ini ditampung setiap 5 mL dan diperoleh 89 fraksi. Fraksi-fraksi dengan pola pemisahan yang sama digabungkan, sehingga diperoleh sembilan fraksi gabungan, yaitu fraksi E₁–E₉.

Fraksi E₃ (0,92 g) dipilih untuk diteruskan ke tahap KKG II menggunakan variasi eluen kloroform 100 %, kloroform:etil asetat (7:3), kloroform:etil asetat (6:4), kloroform:etil asetat (4:6), kloroform:etil asetat (3:7), kloroform:etil asetat (2:8), etil asetat:metanol (8:2), etil asetat:metanol (6:4) dan metanol 100%. Fraksi-fraksi dengan pola pemisahan yang sama digabungkan, sehingga diperoleh lima fraksi gabungan, yaitu fraksi E_{3.1}–E_{3.5}. Fraksi E_{3.3} (0,085 g) dipilih untuk dilanjutkan ke tahap KLT dua dimensi. Isolat E_{3.3} kemudian ditentukan karakteristik fisiknya meliputi wujud dan titik leleh serta karakteristik kimia melalui analisis spektrum UV, IR, ¹H-NMR dan ¹³C-NMR.

Uji sitotoksik secara metode MTT. Sel dengan konsentrasi 3 x 10³ sel/100 µL didistribusikan ke dalam sumuran dan diinkubasi selama 24 jam di dalam inkubator CO₂ agar sel beradaptasi dan menempel di sumuran. Selanjutnya pada tiap sumuran ditambahkan 100 µL MK RPMI 1640 yang mengandung sampel dengan variasi kadar dan diinkubasi kembali selama 48 jam. Pada akhir inkubasi, media kultur yang mengandung sampel dibuang dan dicuci dengan 100 µL PBS. Kemudian ke dalam masing-masing

sumuran ditambahkan 100 μ L media kultur yang mengandung MTT dan diinkubasi kembali selama 4 jam pada suhu 37 °C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formazan yang berwarna ungu. Setelah 4 jam, pada tiap sumuran ditambahkan reagen stopper untuk membunuh sel dan melarutkan kristal formazan. *Plate* dihomogenkan selama 10 menit kemudian diinkubasi pada suhu kamar dalam ruang gelap selama semalam. Selanjutnya, absorbansi tiap sumuran dibaca dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 595 nm.

Data yang diperoleh berupa absorbansi masing-masing sumuran dikonversi ke dalam persen sel hidup dan dianalisis dengan statistik, menggunakan metode uji korelasi yang diikuti dengan uji signifikansi untuk mengetahui signifikansi perbedaan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Persen sel hidup dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ hidup} = \frac{\text{Absorbansi sel dengan perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi kontrol sel} - \text{Absorbansi kontrol media}} \times 100 \%$$

IC₅₀ dihitung dengan menggunakan metode log probit untuk mendapatkan linearitas antara log konsentrasi dengan persen sel hidup sehingga dapat diketahui potensi sitotoksitasnya. IC₅₀ adalah konsentrasi yang menyebabkan penurunan 50 % populasi sel.

PEMBAHASAN

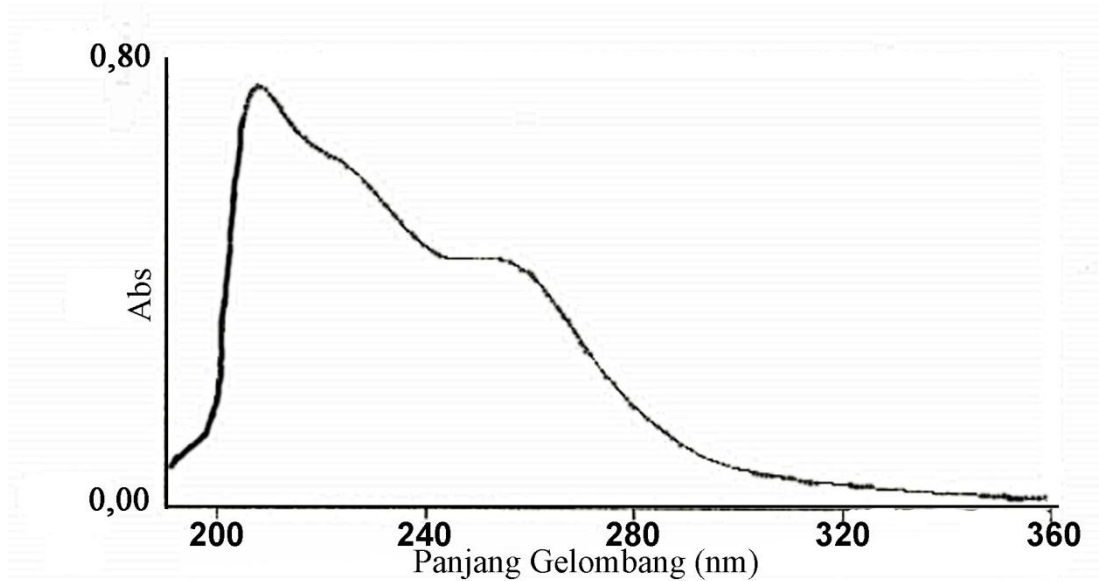
Ekstrak dan fraksi-fraksi dari buah *B. javanica* (L.) Merr. diuji fitokimia untuk mengetahui kandungan golongan terpenoid secara kualitatif. Reaksi positif golongan terpenoid ditunjukkan dengan warna merah muda, merah dan ungu jika dilakukan penambahan reaksi Liebermann-Burchard (LB). Jika intensitas warna semakin kuat, maka dapat diprediksi senyawa yang terkandung juga semakin banyak.

Berdasarkan uji fitokimia yang dilakukan diketahui bahwa pada ekstrak metanol, fraksi etil asetat dan fraksi metilen klorida dari buah *B. javanica* (L.) Merr. mengandung golongan terpenoid. Ketiga fraksi tersebut menunjukkan reaksi positif adanya golongan terpenoid. Bahkan, fraksi metilen klorida dan fraksi etil asetat sama-sama memberikan perubahan warna yang menunjukkan adanya golongan terpenoid, sehingga dipilih salah satu fraksi yang akan diteruskan untuk diteliti. Pemilihan fraksi dapat dilakukan berdasarkan kuantitas fraksi, tetapi pada penelitian ini, pemilihan fraksi yang akan diteruskan untuk diteliti mengacu pada uji aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa. Oleh

karena itu berdasarkan hasil uji aktivitas, fraksi yang akan diteruskan ke tahap selanjutnya adalah fraksi etil asetat. Fraksi etil asetat kemudian melalui tahapan pemisahan dan pemurnian sehingga diperoleh isolat E_{3.3}.

Karakterisasi yang dilakukan terhadap isolat E_{3.3} meliputi karakterisasi fisik maupun kimia. Hasil karakterisasi fisika dari isolat E_{3.3} adalah wujud isolat E_{3.3} yang hampir murni diperoleh sebagai padatan amorf berwarna merah kecoklatan. Titik leleh isolat adalah sekitar 202-206 °C. Karakterisasi kimia isolat E_{3.3} dilakukan berdasarkan analisis UV, IR, ¹H-NMR dan ¹³C-NMR.

Karakterisasi isolat E_{3.3} dengan spektrofotometer UV menghasilkan data spektrum seperti pada Gambar 1 dan Tabel 1,



Gambar 1. Spektrum UV Isolat E_{3.3} (dalam pelarut metanol).

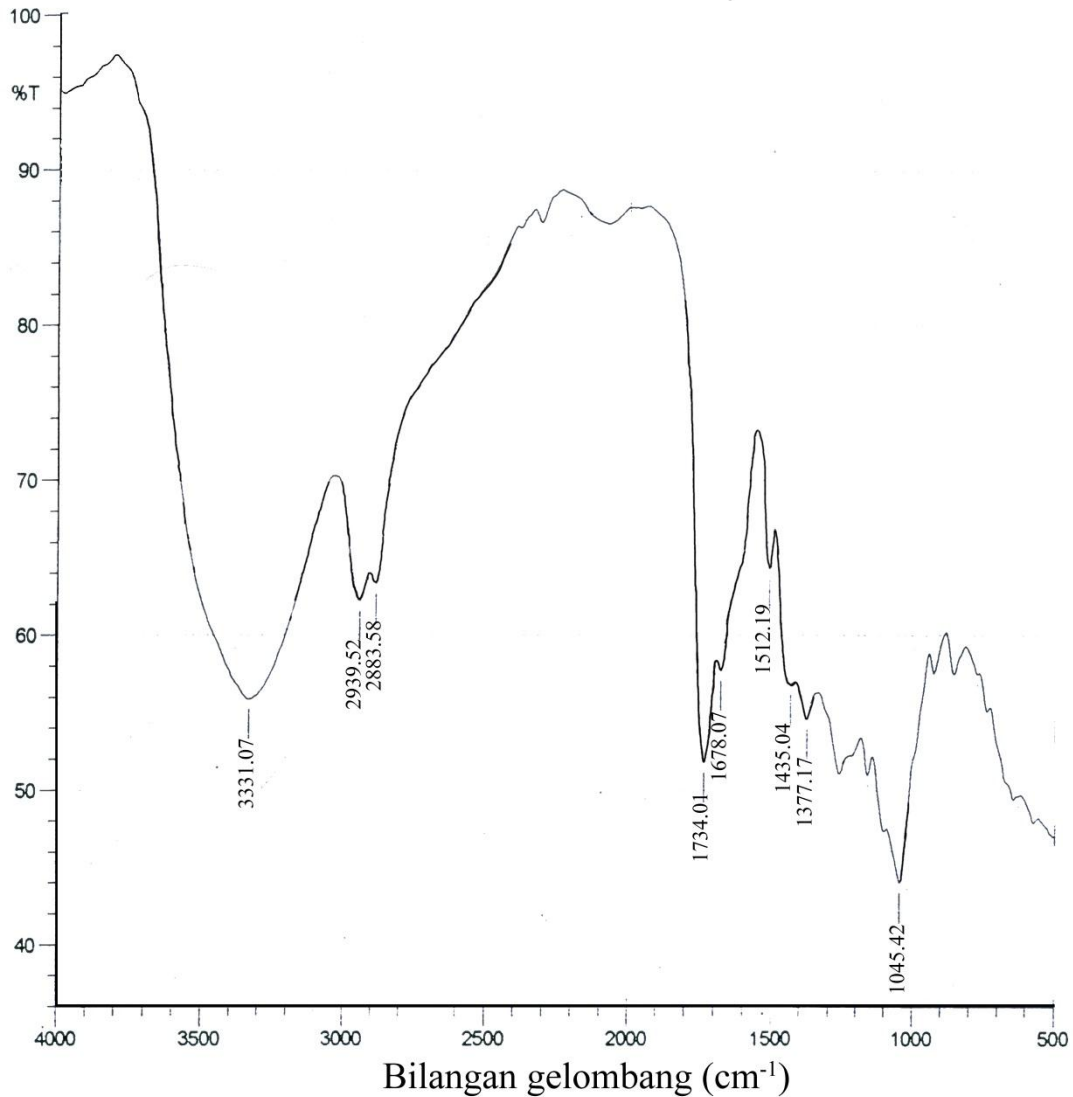
Tabel 1. Data Spektrum UV Isolat E_{3.3} (dalam pelarut metanol)

Panjang gelombang(nm)	Absorbansi
340,4	0,032
251,4	0,047
207,2	0,754

Berdasarkan data tersebut dapat diketahui jenis transisi dan gugus kromofor yang menyebabkan terjadinya transisi. Transisi elektronik yang terjadi antara lain $n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, dan $n \rightarrow \sigma^*$. Transisi elektronik $n \rightarrow \pi^*$ dapat disebabkan oleh gugus yang mempunyai pasangan elektron bebas dan mempunyai orbital molekul π , contohnya adalah gugus karbonil ($-C=O$). Transisi lainnya yaitu transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ dapat disebabkan oleh gugus yang mempunyai pasangan elektron terkonjugasi atau mempunyai ikatan π , seperti gugus $-C=C$,

sedangkan terjadinya transisi $n \rightarrow \sigma^*$ dapat berasal dari gugus kromofor $-OH$ yang mempunyai pasangan elektron bebas dan orbital molekul σ . Berdasarkan spektrum ultraungu-tampak, diprediksi terdapat gugus α, β -karbonil terkonjugasi pada isolat.

Karakterisasi isolat $E_{3,3}$ dengan spektrofotometri IR menghasilkan data seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2 dan Tabel 2 berikut ini:



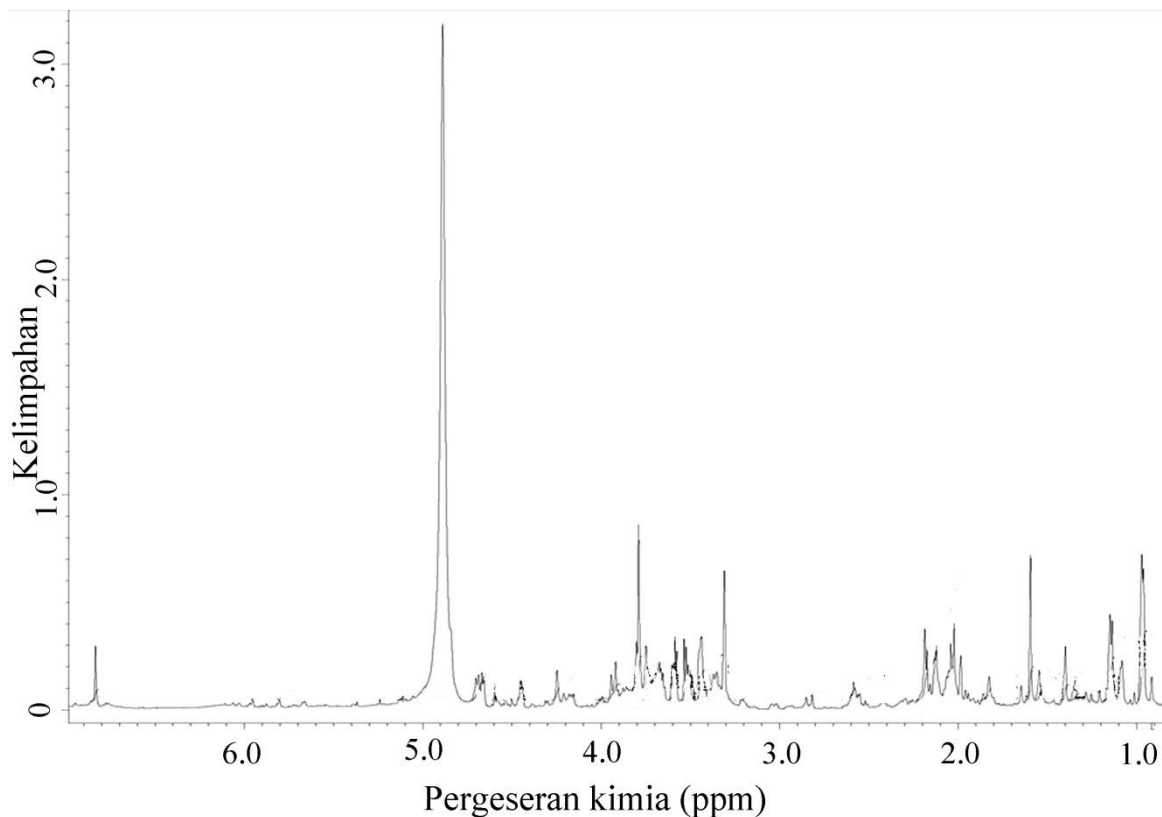
Gambar 2 Spektrum IR Isolat $E_{3,3}$.

Tabel 2. Data Spektrum IR Isolat $E_{3,3}$

Bilangan gelombang (cm^{-1})	Bentuk puncak	Intensitas puncak	Gugus fungsi
3331	lebar	kuat	Regang $-OH$ terikat
2939	lebar	kuat	Regang $-CH_3$
2883	lebar	sedang	Regang $-CH_2$
1734	tajam	kuat	Regang δ -lakton
1678	lebar	kuat	Regang karbonil terkonjugasi
1512	tajam	sedang	Regang $C=C$ alifatik

1435-1377 1045	lebar tajam	kuat kuat	Lentur -CH Regang Eter (-O-)
-------------------	----------------	--------------	---------------------------------

Tabulasi data pergeseran kimia dan jenis proton yang mungkin, hasil dari spektrum $^1\text{H-NMR}$ isolat $\text{E}_{3,3}$ ditunjukkan pada Gambar 3 dan Tabel 3 di bawah ini:



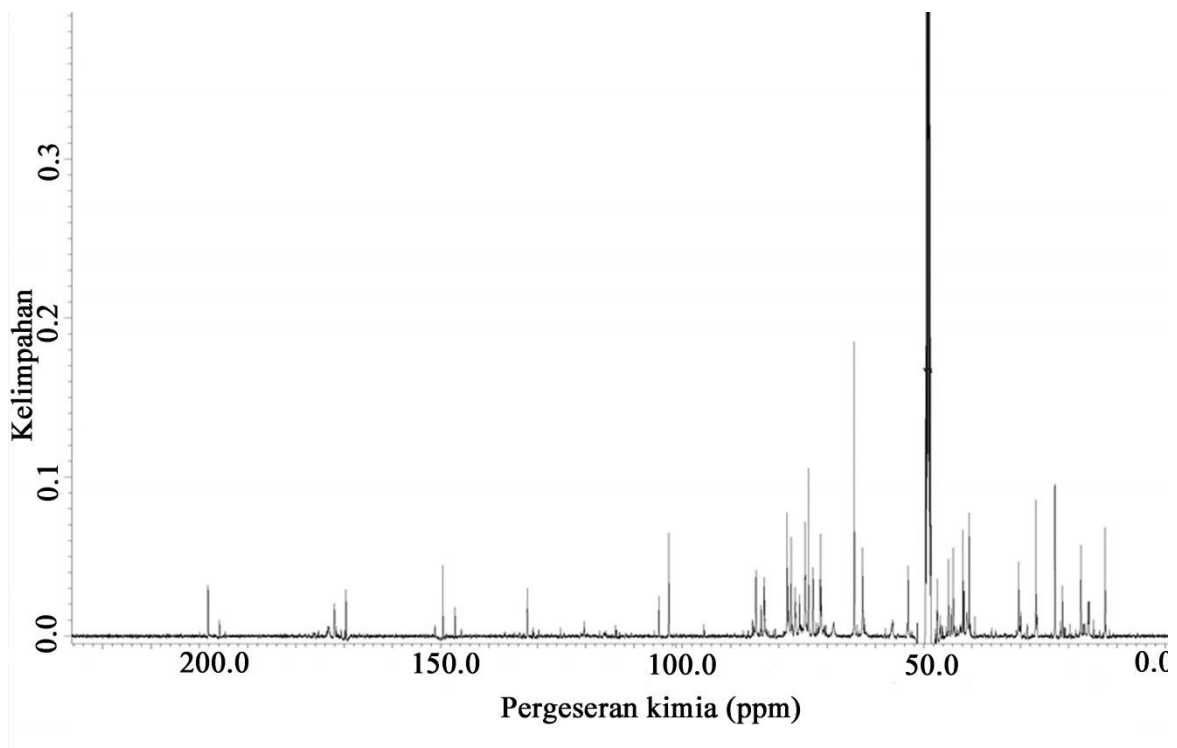
Gambar 3. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ Isolat $\text{E}_{3,3}$.

Tabel 3. Data Spektrum $^1\text{H-NMR}$ Isolat $\text{E}_{3,3}$

Pergeseran kimia(ppm)	Multisiplitas	Jenis proton
1,65	Singlet	CH_3
1,82	Singlet	CH_3
1,98	Singlet	OAc
2,18	Doublet (J=6,7)	$\text{C}=\text{C}-\text{CH}$
2,82	Singlet	$\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2$ (proton α untuk keton)
3,80	Singlet	$-\text{OCH}_3$
3,95	Doublet (J=8)	$-\text{OCH}_2$
4,44	Doublet (J= 8,1)	CH (pada glukosa)
4,58	Doublet (J= 6,75)	CH (pada glukosa)
4,67	Doublet (J= 6,7)	CH (pada glukosa)
4,70	Doublet (J=7,9)	CH (pada glukosa)
6,83	Doublet (J=13)	$\text{C}=\text{O}-\text{CH}-\text{OR}$

Berdasarkan data spektrum $^1\text{H-NMR}$, diketahui bahwa terdapat proton yang menunjukkan pergeseran kimia untuk senyawa quassinoid, antara lain proton α untuk keton yang muncul sebagai sinyal singlet pada daerah 2,82 ppm. Proton $\text{C}=\text{C}-\text{CH}$ yang muncul sebagai sinyal doublet pada daerah 2,18. Beberapa proton metil (CH_3) yang memberikan sinyal singlet pada 1,65 ppm, 1,82 ppm, dan 1,98 ppm. Sinyal untuk proton metoksi muncul pada 3,80 ppm dan 3,95 ppm. Sinyal untuk proton pada unit glukosa muncul sebagai sinyal doublet pada daerah 4,44- 4,70 ppm.

Data pergeseran kimia dan jenis karbon yang terdapat pada senyawa isolat $\text{E}_{3,3}$ diperoleh dari karakterisasi isolat $\text{E}_{3,3}$ menggunakan spektroskopi $^{13}\text{C-NMR}$ dapat dilihat pada Gambar 4 dan Tabel 4 berikut ini:



Gambar 4. Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ Isolat $\text{E}_{3,3}$

Tabel 4. Data Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ Isolat $\text{E}_{3,3}$

Pergeseran kimia (ppm)	Jenis karbon
169,64-198,20	karbonil
102,77-149,60	olefin
82,90-84,74	alkena terkonjugasi
53,24-62,71	metoksi
30,64-51,20	metin dan metilen
12,47-29,8	metil

Berdasarkan spektrum yang diperoleh dapat diketahui adanya pergeseran kimia karbon alifatik, karbon pada gugus karbonil dan karbon pada gugus eter. Pergeseran kimia pada 198,20 ppm menunjukkan adanya karbon α,β -karbonil keton terkonjugasi. Pada daerah 172,04 ppm mengindikasikan pergeseran kimia untuk δ -karbonil lakton terkonjugasi (Kanchanapoom *et al.*, 2001). Pergeseran kimia pada 132,08-169,65 ppm menandakan keberadaan ikatan olefin. Pergeseran kimia pada 53,2 ppm menunjukkan adanya metoksi. Pergeseran kimia 62,71 -104,84 ppm merupakan pergeseran kimia dari karbon pada unit glukosa.

Hasil uji fitokimia dengan reagen LB yang dilakukan pada isolat E_{3.3} menunjukkan bahwa isolat E_{3.3} mengandung senyawa golongan terpenoid. Hasil uji fitokimia tersebut kemudian dilengkapi dengan data spektrum UV, IR, ¹H-NMR, dan ¹³C-NMR untuk mengetahui golongan terpenoid yang terdapat dalam isolat E_{3.3} tersebut. Spektrum UV menunjukkan adanya serapan yang mengindikasikan keberadaan kromofor gugus karbonil -C=O-, C=C, dan gugus-OH. Serapan tersebut mengindikasikan adanya gugus α,β -karbonil terkonjugasi pada senyawa golongan terpenoid yang terkandung dalam isolat E_{3.3}.

Keberadaan gugus α,β -karbonil terkonjugasi didukung pula oleh data yang diperoleh dari spektrum IR. Berdasarkan spektrum IR, dapat diketahui pula gugus fungsi lain yang terkandung dalam isolat E_{3.3} antara lain gugus -OH, -CH₂, -CH₃, δ -lakton, dan eter (-O-). Gugus fungsi δ -lakton yang muncul pada spektrum IM menunjukkan bahwa isolat E_{3.3} mengandung senyawa golongan terpenoid yang memiliki gugus δ -lakton. Hal ini mengindikasikan bahwa golongan terpenoid yang terdapat dalam isolat E_{3.3} adalah quassinoid.

Asumsi tersebut kemudian dikuatkan pula oleh hasil spektrum ¹³C-NMR yang menunjukkan adanya pergeseran kimia yang mengindikasikan keberadaan karbon α,β -karbonil keton dan δ -karbonil lakton. Pada spektrum ¹H-NMR juga diperoleh indikasi keberadaan gugus β -D-glukopiranosil yang terikat pada kerangka dasar. Hal tersebut dikuatkan dengan data yang diperoleh dari spektrum ¹H-NMR

Berdasarkan spektrum ¹H-NMR, sinyal untuk proton pada unit glukosa muncul sebagai sinyal doublet pada daerah 4,44-4,70 ppm yang mengindikasikan keberadaan β -D-glukosa yang terikat. Konfigurasi D-glukosa merupakan konfigurasi lazim dari glukosa yang ditemukan pada genus Simaroubaceae. Selain itu, spektrum ¹H-NMR juga menunjukkan adanya pergeseran kimia untuk beberapa proton metil (CH₃) yang memberikan sinyal singlet pada 1,65 ppm, 1,82 ppm, dan 1,98 ppm. Sinyal yang menunjukkan keberadaan proton metoksi muncul pada 3,80 ppm dan 3,95 ppm. Sinyal

proton α untuk keton ($\text{CH}_2\text{-CO}$) yang muncul sebagai sinyal singlet pada daerah 2,82 ppm dan dan sinyal proton $\text{C}=\text{C}\text{-CH}$ yang muncul sebagai sinyal doublet pada daerah 2,18 mengindikasikan keberadaan α,β -karbonil terkonjugasi.

Berdasarkan data yang diperoleh dari hasil uji fitokimia, data spektrum UV, IR, $^1\text{H-NMR}$, dan $^{13}\text{C-NMR}$, diperoleh asumsi awal bahwa senyawa golongan terpenoid yang terkandung dalam isolat $\text{E}_{3,3}$ adalah quassinoid yang memiliki substituen berupa gugus -OH dan $\beta\text{-D-glukosa}$. Asumsi-asumsi tersebut kemudian dikuatkan dengan perbandingan nilai pergeseran kimia pada data spektrum $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ antara isolat $\text{E}_{3,3}$ dengan senyawa yadanzioside I yang telah berhasil diidentifikasi dari biji *B. javanica* (L.) Merr.

Tabel 5. Perbandingan Pergeseran Kimia $^1\text{H-NMR}$ (dalam ppm) antara Isolat $\text{E}_{3,3}$ (CD_3OD , 500 MHz) dengan Pergeseran Kimia Senyawa yadanzioside I ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 90 MHz).

H	yadanzioside I	Senyawa isolat $\text{E}_{3,3}$
$\text{C}_{(4)}\text{-CH}_3$	2,04 (s)	1,98 (s)
$\text{C}_{(10)}\text{-CH}_3$	1,69 (s)	1,65 (s)
15-H	6,80 (d, J= 13)	6,83 (d, J=13)
CO_2CH_3	3,81 (s)	3,80 (s)

Tabel 6. Perbandingan Pergeseran Kimia $^{13}\text{C-NMR}$ (dalam ppm) antara Senyawa dalam Isolat $\text{E}_{3,3}$ (CD_3OD , 125 MHz) dengan Pergeseran Kimia Senyawa yadanzioside I ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 22,5 MHz).

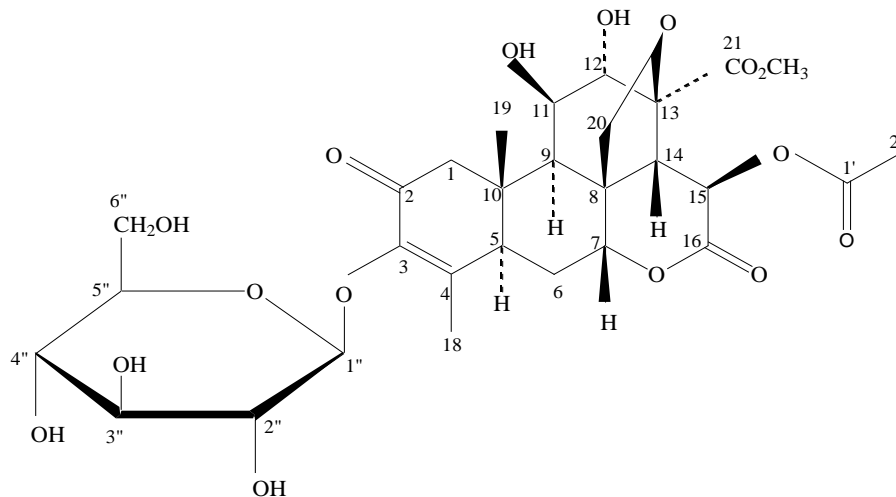
Nomor atom karbon	yadanzioside I	Senyawa isolat $\text{E}_{3,3}$
1	51,0	51,2
2	193,6	198,2
3	148,0	149,5
4	146,8	147,0
5	43,4	43,2
6	29,3	29,8
7	83,5	83,7
8	46,0	46,0
9	42,1	42,2
10	40,8	40,6
11	72,9	72,9
12	76,0	76,6
13	82,7	82,9
14	50,3	-
15	68,7	68,7
16	168,0	169,6
18	15,3	15,8
19	15,8	15,9
20	73,5	73,8
21	171,3	172,0
O- CH_3	52,4	53,2
1'	169,8	170,0

2'	20,6	20,8
β -D-glukopiranosil		
1''	104,8	104,8
2''	75,9	75,7
3''	78,5	78,4
4''	71,5	71,4
5''	78,3	78,3
6''	62,8	62,8

Hasil perbandingan yang dilakukan menunjukkan kecenderungan kemiripan antara senyawa yang terdapat dalam isolat E_{3.3} dengan pergeseran kimia senyawa yadanzioside I. Data perbandingan pergeseran kimia ¹H-NMR dan ¹³C-NMR antara senyawa yang terdapat dalam isolat E_{3.3} dengan pergeseran kimia senyawa yadanzioside I dapat dilihat pada Tabel 5. dan Tabel 6.

Dengan demikian, berdasarkan data-data spektrum UV, IR, ¹H-NMR dan ¹³C NMR dan didukung oleh data perbandingan pergeseran kimia ¹H-NMR dan ¹³C-NMR (dalam ppm) antara senyawa yang terdapat dalam isolat E_{3.3} dengan pergeseran kimia senyawa yadanzioside I, maka isolat E_{3.3} diprediksi merupakan senyawa Yadanzioside I (Picras 3-en-21-asam oat,15-(asetiloksi)-13, 20-epoksi-3-(β -D-glukopiranosiloksi)-11,12-dihidroksi-2,16-diokso,metil ester).

Isolat E_{3.3} telah dilakukan uji sitotoksik menggunakan metode *MTT assay* menunjukkan IC₅₀ 9,7 μ g/mL terhadap sel HeLa. Senyawa ini dapat menurunkan viabilitas sel HeLa dibandingkan dengan kontrol sel. Efek sitotoksik yang diberikan merupakan efek tergantung kadar dimana makin besar kadar maka makin besar pula efek sitotoksiknya. Aktivitas sitotoksik ini diduga sebagai efek adanya gugus lakton, jembatan oksigen dan gugus karbonil dalam senyawa tersebut. Sifat sitotoksik pada isolat E_{3.3} dapat dikaitkan dengan kemampuannya untuk memacu terjadinya *cell cycle arrest* atau memacu apoptosis pada sel HeLa, namun hal ini perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan uji *doubling time* dan pengecatan DNA. Berdasarkan *American Cancer Institute* suatu senyawa menunjukkan potensi yang signifikan sebagai antikanker jika IC₅₀ \leq 30 μ g/mL (Suffness and Pezzuto, 1999). Oleh karena itu jika dikaitkan dengan IC₅₀ isolat E_{3.3} maka dapat dikatakan isolat E_{3.3} berpotensi kuat sebagai antikanker terhadap sel HeLa.



Gambar 1. Senyawa isolat E_{3,3} (senyawa ydanzioside I)(Sakaki *et al.*, 1986).

KESIMPULAN

Isolat E_{3,3} yang diperoleh berbentuk padatan amorf berwarna merah kecoklatan dengan titik leleh 202-206 °C. Isolat E_{3,3} diprediksikan sebagai kerangka senyawa ydanzioside I (Picras 3 – en – 21 - asam oat, 15 - (asetiloksi) - 13, 20 – epoksi – 3 - (β-D-glukopiranosiloksi) - 11, 12 –dihidroksi - 2, 16 – diokso -, metil ester yang menunjukkan aktivitas sitotoksik (IC₅₀) 9,7 µg/mL menggunakan metode MTT terhadap sel HeLa.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada staf Herbarium Bogoriense Balitbang Botani-Puslitbang Biologi LIPI Bogor yang telah mengidentifikasi sampel tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini dan juga kepada staf LIPI Serpong yang telah membantu pengukuran spektrum ¹H-NMR dan ¹³C-NMR.

DAFTAR PUSTAKA

- Guo, Z., Vangapandu, S., Sindelar, R.W., Walker, L.A., and Sindelar, R.D., 2005, Biologically Active Quassinoid and Their Chemistry : Potential Leads for Drug Design, *Current Medicinal Chemistry Journal*,. vol.12, pp. 173-190.
- Ismail, N., Abdullah, H., Jamil, S., Jamalullail, S. M. S. S., Rotondo, D., and Seidel, V., 2012, Anticancer and Immunomodulating Activity of a Flavonoid from *Brucea javanica* Leaves, *UMT 11th International Annual Symposium on Sustainability Science and Management*, 09th – 11th July 2012, Trengganu, Malaysia
- Kanchanapoom, T., Kasai, R., Chumsri, P., and Yamasaki, K., 2001, Quassinoids from *Eurycoma harmandiana*, *Phytochemistry Journal*, vol. 57, pp. 1205-1208.

- Kim, I. H.; Takashima, S.; Hitotsuyanagi, Y.; Hasuda, T., and Takeya, K., 2004^a, New Quassinoid, Javanicolides C and D and Javanicosides B-F, from Seeds of *Brucea javanica*, *Journal of Natural Products*, vol. 67, no. 5, pp. 863-866.
- Kim, I. H., Takashima, S., Hitotsuyanagi, Y., Hasuda, T., and Takeya, K., 2004^b, Quassinoid Xylosides, Javanicosides G and H, from Seeds of *Brucea javanica*, *ChemInform*, vol. 35, no. 50, DOI: 10.1002/chin.200450181.
- Kim, J.A., Lau, E.K., Pan, L., and De Blanco, E.J.C., 2010, NF- κ B Inhibitors from *Bruceajavanica* Exhibiting Intracellular Effects on Reactive Oxygen Species, *Anticancer Research Journal.*, vol. 30, pp. 3295-3300
- Kitagawa, I., Mahmud, T., Simanjuntak, P., Hori, K., Uji, T. and Shibuya, H., 1994, Indonesian Medical Plants, VIII, Chemical Structures of Three New Triterpenoids, Brucejavanin A, Dihydrobruceajavanin A, and Bruceajavanin B and A New Alkaloidal Glycoside, Bruceacanthinoside, from the Steam of *Brucea javanica* (Simaroubaceae), *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 42, no. 7, pp. 1416-1421.
- Lau, F.Y., Chui, C.H., Gambari, R., Kan, S.K.L., Cheng, G.Y.M., Min, R.S., Teo, I.T.N., Cheng, C.H., Kwon, T.S., Chan, A.S.C., and Tang, J.C.O., 2005, Antiproliferative and Apoptosis-inducing Active *Brucea javanica* Extract on Human Carcinoma, *International Journal of Molecular Medicine.*, vol. 16, pp. 1157-1162.
- O'Neill, M.J., Bray, D.H., Boardman, P., Chan, Philipson, J.D., Warhurst, D.C., and Peters, W., 1987, Plants as Sources of Antimalaria Drugs, Part 4¹ : Activity of *Brucea javanica* Fruits Against Chloroquine-Resistant *Plasmodium falciparum* In Vitro and Against *Plasmodium berghei* In Vivo, *Journal of Natural Products.*, vol. 50, no. 1, pp. 41-48.
- Roswiem, A.P., Kiranadi, B., Bachtiar, T.S.P., and Ranasasmita, R., 2012, Antihypertensive Effect of *Bruceajavanica* (L.) Merr. Fruit Extract, *Makara Journal of Science*, vol. 16, no. 2, pp. 71-76.
- Sakaki, T., Yoshimura, S., Tsuyuki, T., Takahashi, T., and Honda, T., 1986, Yadanzioside P, A New Antileukemic Quassinoid Glycoside from *Brucea javanica* (L.) Merr with the 3-O-(β -D-Glucopyranosyl) Bruceantin Structure, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.*, vol. 34, no. 10, pp. 4447-4450.
- Su, B.N., Chang, L.C., Park, E.J., Cuendet, M., Santarsiero, B.D., Masecar, A.D., Mehta, R.G., Fong, H.H., Pezzuto, J.M., and Kinghorn, A.D., 2002, Bioactive Constituents of the Seeds of *Brucea javanica*, *Planta Medica*, vol. 68, no. 8, pp.730-733.
- Suffness, M., and Pezzuto, J.M., 1999, Assay Related to Cancer Drug Discovery, in Hostettmann, K. (Ed), *Methods in Plant Biochemistry : Assay for Bioactivity*, vol. 6, Academic Press, London, pp. 71-133.
- Zhang, L., Feng, X., Ma, D., Yang, J., Jiang H., Zhang, J., and He, W., 2013, Brusatol Isolated from *Brucea javanica* (L.) Merr Induces Apoptotic Death of Insect Cell Line, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 107, no. 1, pp. 18-24.