

**POTENSI SITOTOKSIK SENYAWA SANTON  
DARI TUMBUHAN GARCINIA COWA ROXB  
TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D**

**POTENSI SITOTOKSIK SENYAWA SANTON  
DARI TUMBUHAN GARCINIA COWA ROXB  
TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D**



**Fatma Sri Wahyuni  
Netty Suhatri  
Meri Susanti  
Dira Melni  
Bachriyanus**

**POTENSI SITOTOKSIK SENYAWA SANTON DARI  
TUMBUHAN GARCINIA COWA ROXB TERHADAP  
SEL KANKER PAYUDARA T47D**

**Fatma Sri Wahyuni**

**Netty Suhatri**

**Meri Susanti**

**Dira Hefni**

**Dachriyanus**



# **POTENSI SITOTOKSIK SENYAWA SANTON DARI TUMBUHAN GARCINIA COWA ROXB TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D**

- Penulis** : Fatma Sri Wahyuni  
Netty Suhatri  
Meri Susanti  
Dira Hefni  
Dachriyanus
- Desain Sampul** : Syamsul Hidayat
- Tata Letak** : Syamsul Hidayat  
Ikhsanul Anwar  
Suci Ramadhanty
- ISBN** : 978-623-7763-70-3
- Ukuran Buku** : 15,5 x 23 cm
- Tahun Terbit** : 2020
- Cetakan** : Pertama
- Anggota** : *Asosiasi Penerbit Perguruan Tinggi Indonesia (APPTI)*

**Dicetak dan diterbitkan oleh :**

*Andalas University Press  
Jl. Situjuh No. 1, Padang 25129  
Telp/Faks. : 0751-27066  
email : cebitunand@gmail.com*

**Hak Cipta Pada Penulis © 2020**

**Hak Cipta dilindungi Undang-Undang.**

*Dilarang mengutip atau memperbanyak sebahagian atau seluruh isi buku tanpa izin  
tertulis dari penerbit.*

## **KATA PENGANTAR**

Alhamdulillah, dengan mengucapkan syukur kepada Allah SWT, akhirnya penulisan buku Potensi Sitotoksik Senyawa Santon dari Garcinia cowa Terhadap Sel Kanker Payudara T47D. Penulisan buku ini merupakan luaran tambahan dari penelitian dengan nomor kontrak DRPM no 123/SP2H/AMD/LT/DRPM/2020 dan LPPM Unand no T/10/UN.16.17/PT.01.03/WCR-Kesehatan yang dilakukan oleh penulis tentang potensi tumbuhan ini.

Buku ini terdiri dari lima bab, dimana pada bagian pertama dimulai dengan Pendahuluan yang menguraikan tentang latar belakang dan tujuan dari penelitian tentang Isolasi Kandungan Kimia dari Tumbuhan Garcinia cowa Roxb Serta Aktivitas Sitotoksik Terhadap Human Breast Cancer T47D, kemudian dilanjutkan dengan Tinjauan Pustaka mengenai tumbuhan Garcinia cowa Roxb dari berbagai sumber Pustaka dan laporan penelitian. Bagian ketiga membahas tentang metode penelitian Isolasi Kandungan Kimia dari Tumbuhan Garcinia cowa Roxb Serta Aktivitas Sitotoksik Terhadap Human Breast Cancer Linn T47D, disusul dengan pembahasan hasil penelitian dan ditutup dengan kesimpulan dan saran. Maksud penerbitan buku ini adalah untuk membantu mahasiswa farmasi yang akan dan sedang melaksanakan penelitian dalam topik isolasi dan uji aktivitas sitotoksik tumbuhan genus garcinia.

Kami menyadari bahwa buku ini masih jauh dari kesempurnaan, karenanya diharapkan saran yang konstruktif dan membangun untuk perbaikan buku ini di masa datang

Padang, Oktober 2020

Penulis

# DAFTAR ISI

<b>KATA PENGANTAR</b>	iii
<b>DAFTAR ISI</b>	v
<b>1. PENDAHULUAN</b>	1
1.1 Belakang Penelitian	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat Kajian	3
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA</b>	5
2.1 Morfologi <i>Garcinia cornea</i> Roxb	5
2.2 Morfologi <i>Garcinia cowa</i> Roxb	6
2.3 Kegunaan Tumbuhan <i>Garcinia</i>	6
2.4 Kandungan Kimia Tumbuhan <i>Garcinia</i>	7
2.4.1 Senyawa golongan santon	7
2.4.2 Senyawa golongan benzofenon	16
2.5 Biosintesis Santon dan Hubungannya dengan Benzofenon	19
2.6 Senyawa sitotksik dari Tumbuhan <i>Garcinia</i>	22
2.7 Sititksik dan Metode Uji Aktivitasnya	23
2.8 Pemisahan dan Pemurnian Kandungan Kimia <i>Garcinia cowa</i>	25
<b>3. METODE PENELITIAN</b>	27
3.1 Isolasi Kandungan Kimia dari Tumbuhan <i>Garcinia cornea</i> Roxb. dan <i>Garcinia cowa</i> Roxb. Serta Aktivitas Sitotoksik terhadap Human Breast Cancer Cell Line T47D	27
3.2 Alat dan Bahan penelitian	27
3.3 Metode Penelitian	28
3.4 Prosedur Penelitian	29
<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	35

4.1. Ekstraksi Kulit Batang <i>G. cornea</i> dan <i>G. cowa</i>	35
4.2. Isolasi dan Pemurnian Senyawa dari Fraksi Etil asetat Kulit Batang <i>G. Cornea</i>	35
4.3. Isolasi dan Pemurnian Senyawa dari Fraksi n-Heksan Kulit Batang <i>G. Cowa</i>	36
4.4. Penentuan Struktur	38
4.5. Kajian Biogenesis Senyawa Hasil Isolasi	66
4.6. Aktivitas Sitotoksik Senyawa Hasil Isolasi	70
4.7. Hubungan Struktur-Aktivitas Senyawa Hasil Isolasi dari Genus <i>Garcinia</i>	72
<b>5. KESIMPULAN DAN SARAN</b>	<b>75</b>
5.1 Kesimpulan	75
5.2 Saran	76
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	<b>77</b>

# 1

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang Penelitian

Garcinia adalah salah satu dari genus tumbuhan buah dalam famili Guttiferae dengan jumlah spesies yang banyak. Genus tumbuhan ini terkenal dengan nama kelompok manggis-manggisan, tersebar di daerah dataran rendah hutan tropis Asia, Afrika, New Caledonia, dan Polynesia (Merza *et al.*, 2004). Di Indonesia sekitar 91 spesies tersebar di pulau Sumatera, Jawa, Sulawesi, dan Maluku (Sari R., 2005). Secara morfologi, kekhasan tumbuhan genus ini dapat dilihat dari batangnya, dimana bila dilukai akan mengalir cairan kekuning-kuningan. Cairan tersebut dapat digunakan untuk pewarna sampai pengobatan. Bagian kayu kelompok tumbuhan ini digunakan sebagai perabot rumah tangga, kulit kayu, dan daun dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Buah dari tumbuhan ini umumnya dapat dimakan seperti buah *G. mangostana*, *G. dioica*, dan *G. dulcis* (Heyne, 1987).

Dari genus *Garcinia* masyarakat Jawa Barat lebih mengenal *G. mangostana* (manggu) dan *G. dulcis* (mundu). Spesies lain yang kurang dipublikasi adalah *G. cornea* dan *G. cowa*. Tumbuhan *G. cowa* oleh masyarakat Sumatera Barat dikenal dengan nama asam kandis dan *G. cornea* oleh masyarakat Jawa Barat disebut manggu leuweung (Heyne, 1987). Secara tradisional kulit batang *G. cowa* telah digunakan sebagai antipiretik dan antimikroba (Na Pattalung *et al.*, 1994; Likhitwitayawuid *et al.*, 1997; dan Mahabusarakam *et al.*, 2005), buah, dan daun untuk memperlancar peredaran darah, ekspektoran, pencahar, serta akarnya untuk menurunkan demam (Panthong *et al.*, 2006). Keragaman manfaat tumbuhan *Garcinia* sebagai obat tradisional tersebut terkait dengan kandungan kimianya.

Beberapa spesies dari genus ini telah diteliti secara berkesinambungan baik kandungan kimia maupun aktivitas biologinya. Pada genus *Garcinia* ini banyak ditemukan senyawa santon, benzofenon, depsidon dan triterpen yang bersifat anti bakteri, antioksidan, dan antikanker (Panthong *et al.*, 2006; Lannang *et al.*, 2005; dan Vieira *et al.*, 2004).

Dari penelusuran pustaka telah dilaporkan bahwa beberapa spesies dari genus *Garcinia* mengandung senyawa antikanker yang sangat potensial dari golongan santon antara lain 1-*O*-metilgarsinon dari *G. bracteata* dengan sel uji KB (Thoison *et al.*, 2000) dan 7-*O*-metilgarsinon dari *G. fusca* dengan sel uji Raji (Ito *et al.*, 2003); golongan benzofenon yaitu maklurin dari *G. assigu* dengan sel uji Raji (Ito *et al.*, 2003) dan garsiniellipton FB dari *G. subelliptica* dengan sel uji MCF-7 (Wu *et al.*, 2005). Selain itu juga ditemukan dari golongan depsidon yaitu garsidepsidon A dari *G. parvifolia* dengan sel uji P-388 (Xu *et al.*, 2000), serta golongan triterpen antara lain friedolanostan 2b dari *G. speciosa* dengan sel uji MCF-7 (Vieira *et al.*, 2004).

Wahyuni *et al.* (2003a-b) telah melakukan penapisan aktivitas antikanker dari ekstrak etanol terhadap beberapa spesies *Garcinia*, dengan menggunakan sel uji MCF-7. Dari data penapisan terlihat hasil yang sangat potensial dari tumbuhan *G. cornea* dan *G. cowa*. Selain itu hasil uji toksisitas secara *in vivo*, menunjukkan bahwa ekstrak tumbuhan ini tidak berefek toksik terhadap hewan uji. Hal ini menstimulasi untuk dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap kedua spesies ini.

Berdasarkan studi pustaka dan skrining awal aktivitas antikanker, memungkinkan untuk diperolehnya senyawa yang bersifat sitotoksik dari *G. cornea* dan *G. cowa*. Dengan demikian *G. cornea* dan *G. cowa* sangat menarik untuk diteliti lebih lanjut guna memperoleh model molekul antikanker.

Dalam buku ini dipaparkan bagaimana isolasi dan karakterisasi senyawa antikanker dari kulit batang *G. cornea* dan *G. cowa*. Isolasi senyawa aktif dilakukan melalui pemisahan dan pemurnian menggunakan metode kromatografi. Terhadap isolat murni dilakukan penentuan struktur dengan menggunakan metode spektroskopi ultraviolet, infra merah, resonansi magnetik inti dan spektroskopi massa. Uji aktivitas sitotoksik terhadap isolat murni dilakukan melalui uji *in vitro* menggunakan sel kanker T47D sel kanker payudara manusia (Skehan *et al.*, 1990 dan Chai *et al.*, 1997).

## **1.2. Perumusan Masalah**

Berdasarkan penapisan aktivitas antikanker terhadap ekstrak etanol dari tumbuhan *G. cornea* dan *G. cowa* serta pendekatan studi pustaka, perumusan masalah dalam tulisan ini adalah:



1. Bagaimana struktur molekul senyawa yang berhasil diisolasi dari kulit batang *G. cornea* dan *G. cowa*.
2. Bagaimana sifat aktivitas sitotoksik dari senyawa hasil isolasi terhadap sel kanker payudara manusia T47D.
3. Bagaimana hubungan antara struktur-aktivitas dari senyawa hasil isolasi terhadap sel kanker payudara manusia T47D.

### **1.3. Tujuan**

Maksud tulisan ini adalah memberikan informasi kepada pembaca tentang komponen kimia yang dihasilkan dari *G. cornea* dan *G. cowa*. Selanjutnya untuk melihat profil, bioaktivitas dan hubungan biogenetik dari spesies *Garcinia*.

Tujuan tulisan adalah untuk memberikan pengetahuan dan pelajaran mengenai profil kimia dari *G. cornea* dan *G. cowa*. Data yang disajikan dalam buku ini diharapkan mampu menjelaskan struktur sehingga terlihat hubungan biogenesis dari spesies *Garcinia*. Dari profil akan ditemukan hubungan struktur dan aktivitas yang lebih sempurna. Selain itu juga untuk mempelajari hubungan kemotaksonomi dari spesies *Garcinia*.

### **1.4. Manfaat Kajian**

Tulisan terkait penemuan senyawa potensial yang memiliki aktivitas sitotoksik yang tidak toksik dari tumbuhan *Garcinia* ini, diharapkan akan mampu:

- 1) Melengkapi informasi kandungan kimia dan aktivitas biologi dari genus *Garcinia* umumnya dan khususnya *G. cornea* dan *G. cowa*.
- 2) Mengungkapkan kaitan biogenesis dan hubungan struktur aktivitas dari senyawa hasil isolasi.
- 3) Memberikan sumbangan terhadap perkembangan Ilmu Kimia Bahan Alam khususnya dalam keragaman struktur yang terkandung dari genus *Garcinia*, dan meningkatkan nilai tambah tumbuhan *G. cornea* dan *G. cowa* sebagai sumber senyawa sitotoksik.
- 4) Secara tidak langsung ikut membantu melestarikan tumbuhan endemik lokal (*G. cornea* dari Ambon dan *G. cowa* dari Sumatera Barat ).



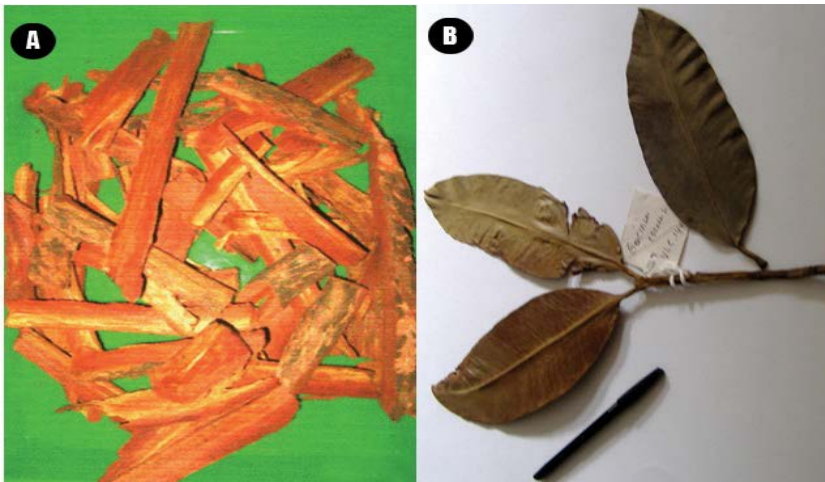
# 2

## TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Morfologi *Garcinia cornea* Roxb.

*G. cornea* (Guttiferae), dikenal dengan nama daerah manggu leuweung (Jawa Barat). Tumbuhan ini mempunyai ketinggian 9 - 12 m, kulit batangnya keras, daun berukuran 30 x 11 sampai 40 x 11 cm bentuknya elip, mengkilat, halus, bercahaya, ukuran petiole 5 - 15 mm dan tebal. Batangnya berwarna kehitaman, kayunya berat, keras dan bergaris garis memanjang. Bunga jantannya berbentuk tunggal berwarna kuning, memiliki sepal 4 dan petalnya berukuran lebih pendek dari sepalnya, pedisel panjangnya 10 - 15 mm berbentuk cekung. Buahnya berukuran 26 x 25 mm, globus, dan berwarna coklat kelam (Maheswari, 1968).

Daerah tumbuh dan penyebarannya di Sumatera, Jawa, Makasar, dan di dataran tinggi Ambon. Di daerah Ambon tumbuhan ini telah dibudidayakan. Morfologi kulit batang dan daun *G. cornea* dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1. Kulit batang (A) dan daun (B) *G. Cornea*

## 2.2 Morfologi *Garcinia cowa* Roxb.

Tumbuhan *G. cowa* (Guttiferae) berupa pohon kecil atau sedang dengan tinggi mencapai 18 m, keliling batang 90 cm. Kulit batang bagian dalam tipis dengan getah berwarna kuning. Daun berbentuk elips dengan rentang 12 x 6 sampai dengan 19 x 8 cm, kedua ujung melancip. Tulang daun sekunder sejajar, muncul pada kedua permukaan 5 - 7 mm. Bunga memiliki 4 sepal dan petal. Bunga jantan membentuk kelompok kecil, terletak di belakang daun, benang sari banyak. Bunga betina juga terletak di belakang daun. Buah berwarna merah, banyak mengandung air, permukaan berkerut, kasar, tidak sama rata, dan terletak di belakang daun (Whitmore, 1973). Morfologi parsial pohon, buah, dan daun *G. cowa* dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2. Pohon dari *G. cowa* (A), buah (B), dan daun (C)

## 2.3 Kegunaan tumbuhan *Garcinia*.

Berbagai species dari genus *Garcinia* diketahui memiliki banyak manfaat, selain sebagai obat tradisional, genus ini juga memiliki aktivitas biologi lain mulai dari antibakteri sampai antikanker. Kulit batang *G. dulcis* dimanfaatkan sebagai obat bengkak kelenjar, kulit batang *G. mangostana* digunakan sebagai obat diare, daunnya dimanfaatkan untuk mengobati radang saluran kemih, kulit buah untuk obat tumor rongga mulut, kerongkongan, serta sariawan. Spesies lainnya *G. macrophylla* dimanfaatkan untuk menghilangkan gatal-gatal (Heyne, 1987). Permana *et al.* (2001), melaporkan buah *G. atroviridis* telah digunakan untuk obat batuk, antiketombe, sakit

telinga, sakit perut yang berhubungan dengan kehamilan dan radang tenggorokan. Daun dan biji *G. dulcis* telah digunakan untuk mengobati kelenjar getah bening, sakit telinga dan kelenjar gondok (Deachathai *et al.*, 2005) serta *G. mangostana* buahnya dimanfaatkan untuk mengobati infeksi kulit, disentri, dan diare (Ji *et al.*, 2007).

Buah dan daun tumbuhan *G. cowa* digunakan untuk memperlancar peredaran darah, ekspektoran, pencahar, dan akarnya untuk menurunkan demam (Panthong *et al.*, 2006). Selain itu buah *G. cowa* digunakan sebagai penyedap masakan atau rempah-rempah dan manisan (Heyne, 1987). Manggis (*G. mangostana*) adalah spesies yang paling banyak dikenal di Indonesia, buahnya dapat dimakan secara langsung dan telah dibudidayakan karena mempunyai nilai ekonomi. Asam gelugur (*G. atroviridis*) dan *G. prainiana* memiliki kulit buah kering yang terkenal sebagai rempah-rempah karena rasanya yang masam. Getah dari *G. hamburie* dimanfaatkan sebagai bahan pewarna (Heyne, 1987). Pemanfaatan lain dari genus *Garcinia* ini adalah kayunya yang dimanfaatkan sebagai peralatan bangunan seperti pegangan pacul, golok, dan sengkop (Maheswari, 1968).

## **2.4 Kandungan kimia tumbuhan *Garcinia***

Tumbuhan *Garcinia* adalah tumbuhan yang kaya akan senyawa metabolit sekunder jenis santon teroksidasi, terprenils, depsidon, dan benzofenon. Golongan senyawa ini mempunyai gugus fungsi fenolik dan cincin trisiklik yang linier, sehingga memiliki aktivitas biologi dan farmakologi yang beragam seperti antibakteri, antioksidan, dan antikanker (Panthong *et al.*, 2006 dan Lannang *et al.*, 2005). Selain itu tumbuhan *Garcinia* juga mengandung senyawa seperti golongan steroid, terpenoid, dan bifenil (Vieira *et al.*, 2004 dan Lannang *et al.*, 2005).

### **2.4.1 Senyawa golongan santon**

Berdasarkan strukturnya, santon mempunyai ciri adanya inti kerangka dibenzo- g-piran. Inti ini memperlihatkan hubungan santon yang dekat dengan flavonoid. Santon di alam umumnya ditemukan dalam bentuk turunan oksigenasi-nya yang berwarna kuning, sehingga istilah santon dalam bahasa Yunani berarti kuning. Kebanyakan dari santon alam telah ditemukan dari dua famili tumbuhan tingkat tinggi yaitu Guttiferae dan Gentianaceae. Pada Guttiferae umumnya

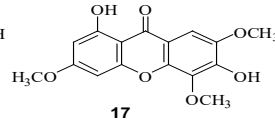
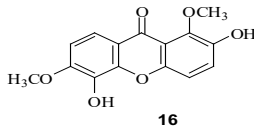
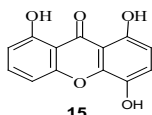
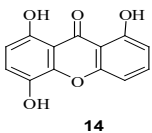
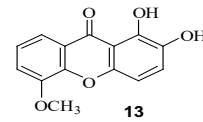
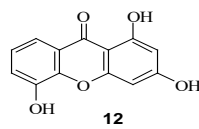
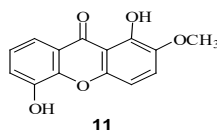
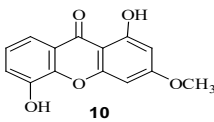
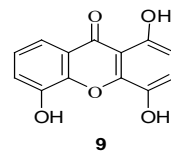
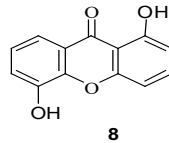
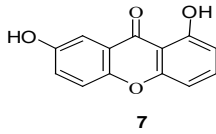
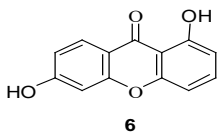
ditemukan jenis santon teroksigenasi sederhana, alkoksisanton, dan santon terprenilasi, sedangkan pada Gentianaceae umumnya ditemukan santon teroksigenasi dengan oksigenasi lebih tinggi dan O-glikosilsanton tetapi tidak ditemukan jenis santon terprenilasi. Santon dan benzofenon telah dilaporkan sebagai komponen utama dari Guttiferae. Atom karbon C-1 sampai C-4 yang terdapat pada cincin A yang berasal dari jalur asetat malonat dikarakterisasi sebagai 1,3-dioksigenasi dan C-5 sampai C-8 dari cincin B yang berasal dari jalur sikimat sering ditemukan oksigenasi pada posisi C-6, C-7, atau C-8. Oksigenasi pada posisi C-1, C-3, C-7, dan C-8 lebih sering ditemukan dari pada posisi C-1, C-2, C-6, dan C-8. Semua santon dari tumbuhan tingkat tinggi umumnya mempunyai oksigenasi pada posisi C-5 dan atau C-7. *Garcinia* sebagai salah satu genus dari famili Guttiferae memiliki kandungan kimia utama golongan santon dalam bentuk teroksigenasi dan terprenilasi (Bennet and Lee, 1989).

Senyawa santon yang teroksigenasi ditemukan berupa mono, di, tri, tetra, dan pentaoksigenasi. Pola oksigenasinya dalam bentuk hidroksil, metoksil, atau metilendioksida. Pada monooksigenasi santon, substitusi terjadi pada posisi C-2 atau C-4, tetapi dari genus *Garcinia* belum pernah ditemukan. Dioksigenasi santon terjadi pada posisi C-1, C-5; C-1, C-7; dan C-2, C-6. Untuk trioksigenasi santon, substitusi terjadi pada C-1, C-3, C-5; C-1, C-5, C-6; dan C-2, C-3, C-4. Tetraoksigenasi santon terjadi pada posisi C-1, C-3, C-5, C-7; C-1, C-3, C-5, C-7; dan C-1, C-3, C-6, C-7. Pada pentaoksigenasi santon, substitusi terjadi pada C-1, C-2, C-3, C-7, C-8 dan C-1, C-3, C-5, C-6, C-7, dan dapat mengalami metilasi sebagian. Beberapa senyawa santon yang telah berhasil diisolasi dari tumbuhan *Garcinia* dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Beberapa senyawa santon teroksigenasi dari genus *Garcinia*

Kerangka	Senyawa	Tumbuhan	Pustaka
Dioksigenasi santon	1,6-Dihidroksisanton (6)	<i>G. viellardii</i>	Hay <i>et al.</i> , 2004
	1,7-Dihidroksisanton (7)	<i>G. xanthochymus</i>	Boggett <i>et al.</i> , 2005
	1,5-Dihidroksisanton (8)		

Trioksigenasi santon	1,4,5-Trihidroksisanton ( <b>9</b> ) 1,5-Dihidroksi-3-metoksisanton ( <b>10</b> ) 1,5-Dihidroksi-2-metoksisanton ( <b>11</b> ) 1,3,5-Trihidroksisanton ( <b>12</b> ) 1,2-Dihidroksi-5-metoksisanton ( <b>13</b> ) 1,5,8-Trihidroksisanton ( <b>14</b> ) 1,4,8-Trihidroksisanton ( <b>15</b> )	<i>G. viellardii</i> <i>G. xanthochymus</i>  <i>G. smeathmanii</i> <i>G. polyantha</i>	Hay <i>et al.</i> , 2004 Bogget <i>et al.</i> , 2005  Komguem <i>et al.</i> , 2005 Lannang <i>et al.</i> , 2005
Tetraoksigenasi santon	2,5-Dihidroksi-1,6-dimetoksisanton ( <b>16</b> )	<i>G. xanthochymus</i>	Boggett <i>et al.</i> , 2005
Pentaoksigenasi santon	3,8-Dihidroksi-2,4,6-trimetoksisanton ( <b>17</b> )	<i>G. dulcis</i>	Deachatai <i>et al.</i> , 2005



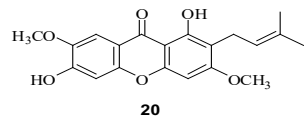
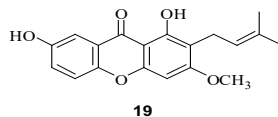
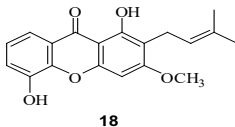
Santon teralkilasi pada umumnya berupa bentuk substitusi mono-C<sub>5</sub> atau di-C<sub>5</sub>. Gugus C<sub>5</sub> yang tersubstitusi umumnya adalah 3-metilbut-2-enil. Substitusi 1,1-dimetilprop-2-enil dapat terjadi tetapi tidak umum dan substitusi ini sering mengalami siklisasi dengan *orto* hidrosil membentuk gugus 2,2-dimetilpiran atau

dihidropiran, 2,2,3-trimetilfuran atau 2-isopropenildihidrofuran. Substitusi C<sub>10</sub> merupakan gabungan dua gugus prenil, meliputi geranyl dan lavandulil. Hidroksilasi dan hidrasi dapat terjadi pada rantai samping. Pola oksigenasi pada santon teralkilasi sedikit bervariasi dibandingkan dengan senyawa tanpa alkilasi. Pentaoksidasi santon sering ditemukan pada Guttiferae, tetapi jarang ditemukan dalam Gentianeae. Substitusi alkil pada senyawa di- dan pentaoksidasi santon jarang ditemukan (Bennet and Lee, 1989).

Monoprenilasi santon ditemukan dalam bentuk trioksidasi santon monoprenilasi dan tetraoksidasi santon monoprenilasi (Bennet and Lee, 1989). Trioksidasi santon monoprenilasi yang telah ditemukan dari genus *Garcinia* dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Beberapa senyawa santon monoprenilasi dari genus *Garcinia*

Senyawa	Tumbuhan	Pustaka
1,5-Dihidroksi-3-metoksi-2-(3-metilbut-2-enil)santon ( <b>18</b> )	<i>G. multiflora</i>	Chiang <i>et al.</i> , 2003
1,7-Dihidroksi-2-(3-metilbut-2-enil)-3-metoksisanton ( <b>19</b> )	<i>G. mangostana</i>	Suksamrarn <i>et al.</i> , 2003
1,6-Dihidroksi-3,7-dimetoksi-2-(3-metilbut-2-enil)santon ( <b>20</b> )	<i>G. smeathmannii</i>	Komguem <i>et al.</i> , 2005
1,5,8-Trihidroksi-3-metoksi-2-(3-metilbut-2-enil)santon ( <b>21</b> )	<i>G. dulcis</i>	Deachathai <i>et al.</i> , 2005
Dulsanton D ( <b>22</b> )		
Dulsanton E ( <b>23</b> )		
Kowagarsinon B ( <b>24</b> )		
Bangangsanton B ( <b>25</b> )	<i>G. cowa</i>	Nilar <i>et al.</i> , 2005
Kowasanton A ( <b>26</b> )	<i>G. polyantha</i>	Lannang <i>et al.</i> , 2005
1,6-Dihidroksi-3,7-dimetoksi-2-(3-metil-2-butenil)santon ( <b>27</b> )	<i>G. mangostana</i>	Mahabusarakam <i>et al.</i> , 2005
	<i>G. cowa</i>	Panthong <i>et al.</i> , 2006



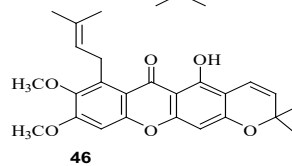
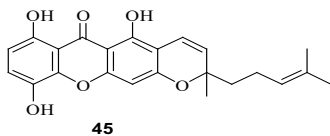
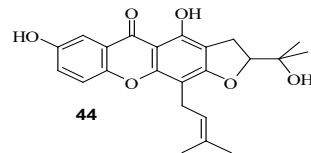
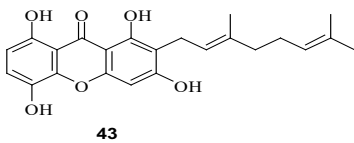
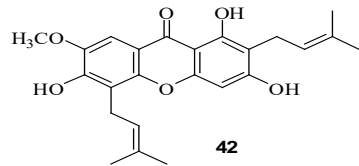
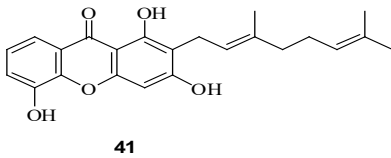
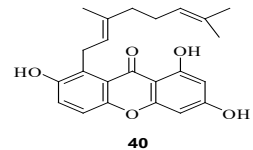
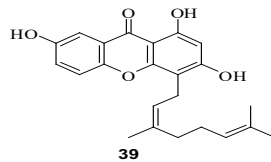
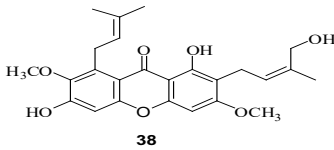
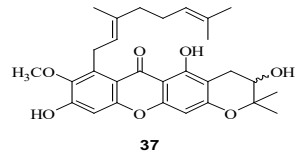
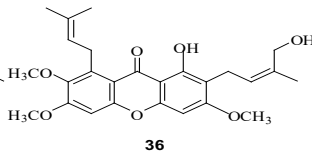
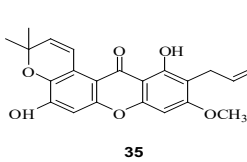
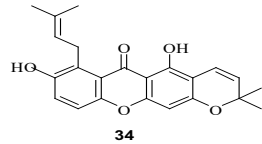
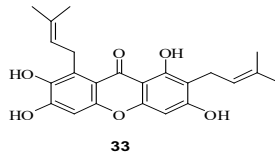
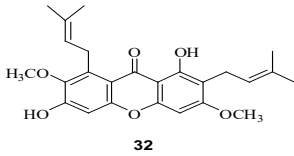
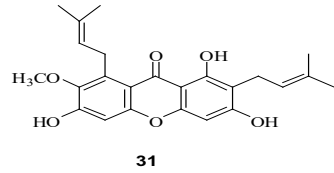
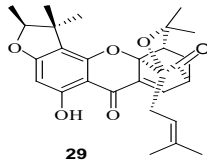
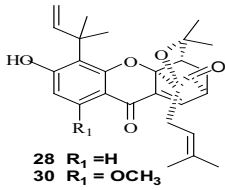


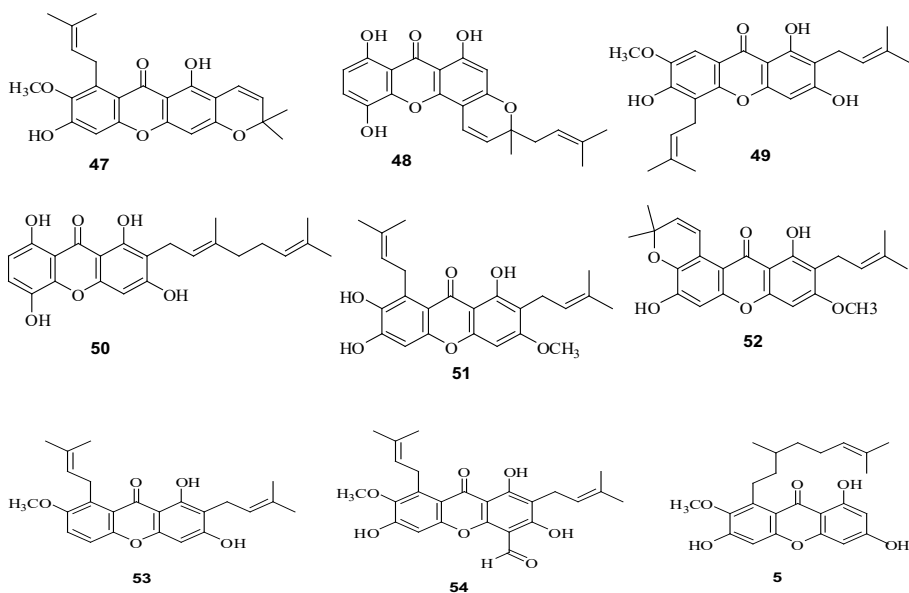


Tabel 3. Senyawa-senyawa santon diprenilasi dari genus *Garcinia*

Senyawa	Tumbuhan	Pustaka
Braktatin (28)	<i>G. bracteata</i>	Thoison <i>et al.</i> , 2000
Isobraktatin (29)	<i>G. mangostana</i>	Suksamrarn <i>et al.</i> , 2003
1- <i>O</i> -Metilbraktatin (30)		
<i>a</i> -Mangostin (31)		
<i>b</i> -Mangostin (32)		
<i>g</i> -Mangostin (33)		
Dimetilkalabasanton (34)		
Mangostenol (35)		
Fuskasanton C (36)	<i>G. fusca</i>	Ito <i>et al.</i> , 2003
Fuskasanton B, D,E dan F (37-40)	<i>G. mangostana</i>	Suksamrarn <i>et al.</i> , 2003
Mangostinon (41)	<i>G. viellardii</i>	Hay <i>et al.</i> , 2004
1,3,6-Trihidroksi-7-metoksi-2,5-di (3-metilbut-2-enil)santon (42)	<i>G. smeathmannii</i>	Komguem <i>et al.</i> , 2005
2-(3,7-Dimetilokta-2,6-dienil)- 1,3,5,8-tetrahidroksi santon (43)	<i>G. mangostana</i>	Nilar <i>et al.</i> , 2005
Mangosanton (44)	<i>G. smeathmannii</i>	Komguem <i>et al.</i> , 2005
Smeathsanton B (45)	<i>G. polyantha</i>	Lannang <i>et al.</i> , 2005
6- <i>O</i> -Metilmangostanin (46)		
Mangostanin (47)		
Bangangsanton A (48)		
1,3,6-Trihidroksi-7-metoksi-2- 5-di- (3-metilbut-2-enil) santon (49)	<i>G. smeathmannii</i>	Komguem <i>et al.</i> , 2005
Smeathsanton A (50)		
Duscisanton A (51)	<i>G. dulcis</i>	Deachathai <i>et al.</i> , 2005
Rubrasanton (5)	<i>G. cowa</i>	Mahabusarakam <i>et al.</i> , 2005, Wahyuni, <i>et al.</i> , 2004a
Kowasanton B (52)		
Kowasanton D (53)	<i>G. cowa</i>	Panthong <i>et al.</i> , 2006
Kowasanton E (54)		

Struktur molekul senyawa santon diprenilasi dari genus *Garcinia* dari **28** sampai dengan **53** adalah sebagai berikut:

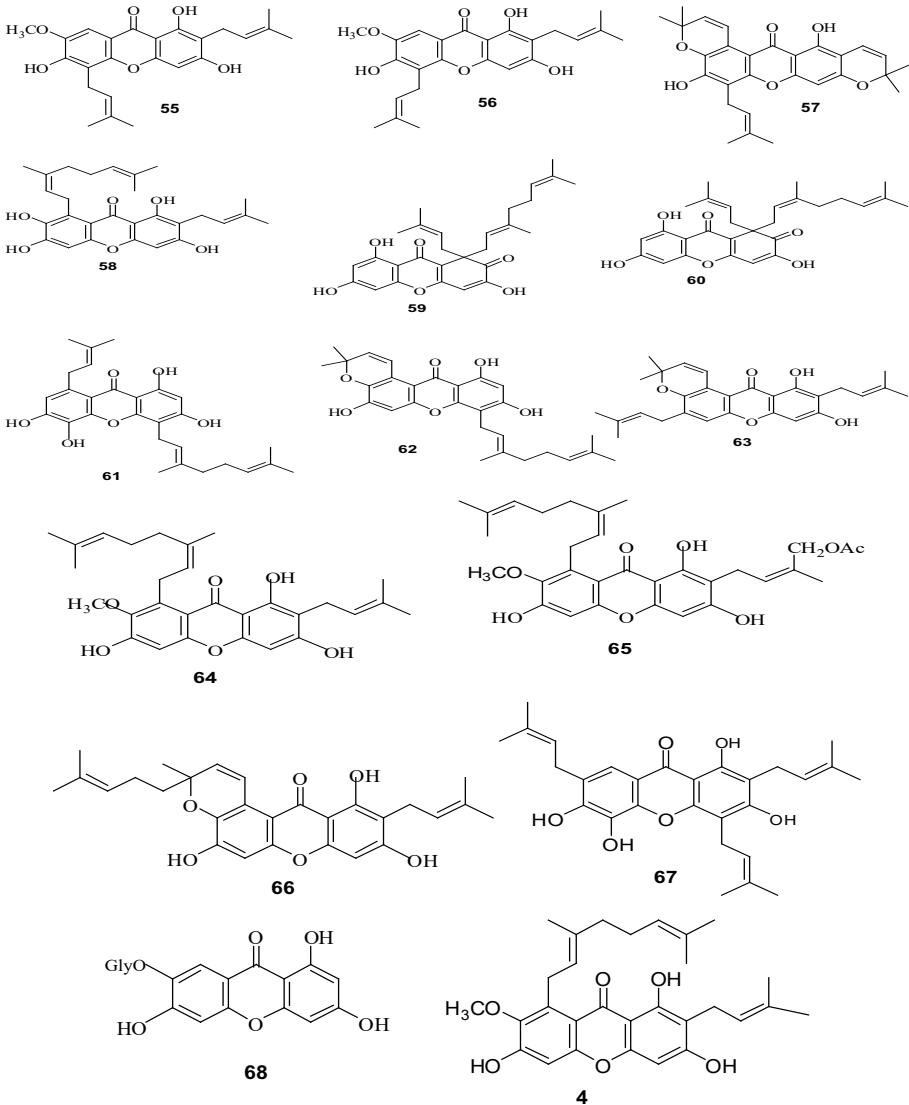




Tabel 4. Beberapa senyawa santon triprenilasi dari genus *Garcinia*

Senyawa	Tumbuhan	Pustaka
7-O-metilgarsinon E (55)	<i>G. cowa</i>	Likhitwitayawuid <i>et al.</i> , 1997
Mangostenon A (56)		
Tovofillin B (57)	<i>G. mangostana</i>	
Kowanin (4)	<i>G. fusca</i> dan <i>G. cowa</i>	Suksamrarn <i>et al.</i> , 2002
Norkowanin (58)		Ito <i>et al.</i> , 2003
Garsinianon A-B (59-60)	<i>G. multiflora</i>	
Virgasanton A (61)	<i>G. virgata</i>	Chiang <i>et al.</i> , 2003
Virgasanton B (62)		Merza <i>et al.</i> , 2004
Dulcisanton A (63)	<i>G. dulcis</i>	
Kowasanton (64)	<i>G. cowa</i>	Deachathai <i>et al.</i> , 2005
Kowagarsinon E (65)		Mahabusarakam <i>et al.</i> , 2005
Kowagarsinon D (66)		
Parvifolisanton A (67)	<i>G. parvifolia</i>	Rukachaisirikul <i>et al.</i> , 2006

Struktur senyawa santon triprenilasi dari genus *Garcinia* dari **55** sampai dengan **67** adalah sebagai berikut:



Santon jenis glikosida ada dua yaitu C-glikosida santon dan O-glikosida santon. Pada C-glikosida santon, residu gula terikat secara C-C pada inti santon, sehingga sifatnya lebih tahan terhadap suasana asam ataupun hidrolisis enzim. Sebaliknya pada O-glikosida santon, residu gula terikat pada inti santon dengan ikatan eterglikosidik,

sehingga lebih mudah terhidrolisis pada suasana asam dan enzimatik. Contoh senyawa santan glikosida adalah 1,3,6,7-tetrahidroksi-7-O-glukosilsanton (**68**) dari *G. mangostana*.

### 2.4.2. Senyawa golongan benzofenon

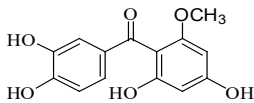
Struktur dasarnya merupakan gabungan dua unit benzen yang terikat pada suatu C karbonil. Pada umumnya senyawa benzofenon jarang ditemui dalam keadaan bebas, tetapi dalam bentuk teroksigenasi atau terprenilasi. Berdasarkan biosintesisnya terlihat hubungan antara senyawa santan dan benzofenon.

#### 1) Benzofenon teroksigenasi

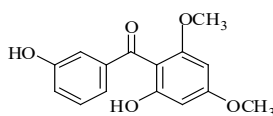
Senyawa golongan ini umumnya tersubstitusi oleh oksigen berupa hidroksil dalam bentuk polioksigenasi. Posisi substitusi biasanya terjadi pada atom karbon C-3', C-6', C-2, C-6 atau C-4, C-6, C-3', C-4'. Beberapa contoh senyawa golongan benzofenon teroksigenasi yang telah ditemukan dari genus *Garcinia* dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Senyawa benzofenon teroksigenasi dari tumbuhan *Garcinia*

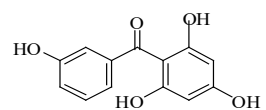
Senyawa	Tumbuhan	Pustaka
4,6,3',4'-Tetrahidroksi-2-metoksibenzofenon ( <b>69</b> )	<i>G. multiflora</i>	Chiang <i>et al.</i> , 2003
6,3'-Dihidroksi-2,4-dimetoksibenzofenon ( <b>70</b> )		
2,4,6,3',-Tetrahidroksi-benzofenon ( <b>71</b> )		
Maklurin ( <b>72</b> )	<i>G. assigu</i>	Ito <i>et al.</i> , 2003
2,6-Dihidroksi-4-metoksibenzofenon ( <b>73</b> )	<i>G. virgata</i>	Merza <i>et al.</i> , 2004
3',6-Dihidroksi-2,4,4'-trimetoksibenzofenon ( <b>74</b> )	<i>G. mangostana</i>	Nilar <i>et al.</i> , 2005



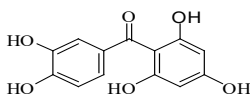
**69**



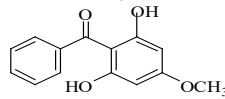
**70**



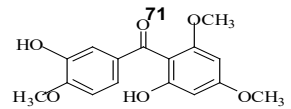
**71**



**72**



**73**



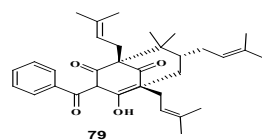
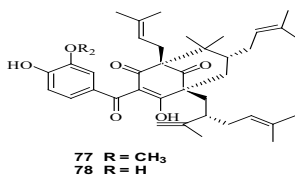
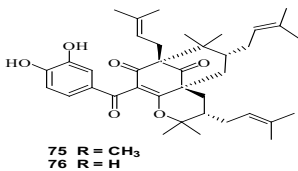
**74**

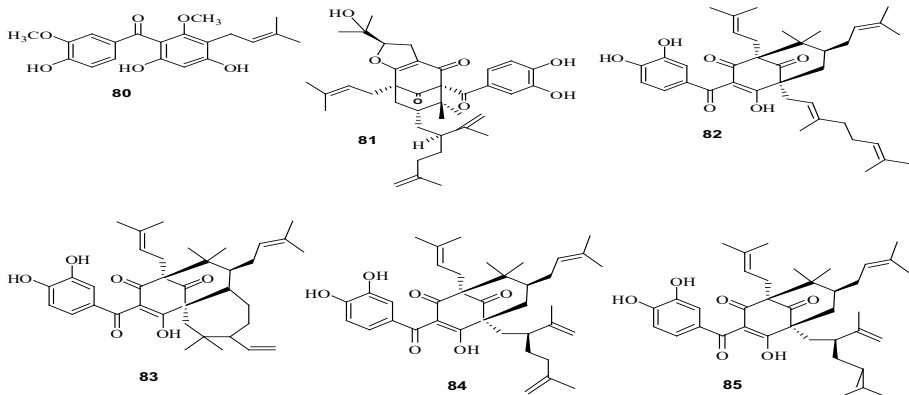
## 2) Benzofenon terprenilasi

Benzofenon teralkilasi pada umumnya berupa substitusi poli- $C_5$ . Gugus  $C_5$  yang tersubstitusi adalah 3-metilbut-2-enil, atau substitusi  $C_{10}$  yang merupakan gabungan dua unit  $C_5$  yang disebut geranil. Unit prenil juga dapat mengalami siklisasi dengan *orto* hidroksil membentuk gugus 2,2-dimetilpiran (dihidropiran), atau 2,2,3-trimetilfuran. Hidroksilasi dan hidrasi dapat terjadi pada inti santon. Posisi terjadinya alkilasi pada inti benzofenon berbeda dari posisi senyawa benzofenon teroksidasi yang umumnya pada C-1, C-3, C-5. Posisi alkilasi umumnya terjadi pada C-2 dan C-4 pada trioksidasi dan tetraoksidasi benzo-fenon. Beberapa jenis senyawa golongan benzofenon terprenilasi dari genus *Garcinia* dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Senyawa benzofenon terprenilasi

No.	Senyawa	Tumbuhan	Pustaka
1	Isogarsinol 13- <i>O</i> -metileter (75)	<i>G. assigu</i>	Ito <i>et al.</i> , 2003
2	Isogarsinol (76)		
3	Garsinol 13- <i>O</i> -metileter (77)		
4	Garsinol (78)	<i>G. multiflora</i>	Chiang <i>et al.</i> , 2003
5	Klusianon (79)		
6	4,6,4'-Trihidroksi-2,3'-dimetoksi-3-prenilbenzofenon (80)	<i>G. subelliptica</i>	Wu <i>et al.</i> , 2005
7	Garsiniellipton FB (81)	<i>G. griffithii</i>	
8	Guttiferon I (82)	<i>G. xanthochymus</i>	Nilar <i>et al.</i> , 2005
9	Guttiferon H (83)		
10	Santosimol (84)		
11	Guttiferon F(85)	Boggett <i>et al.</i> , 2005	





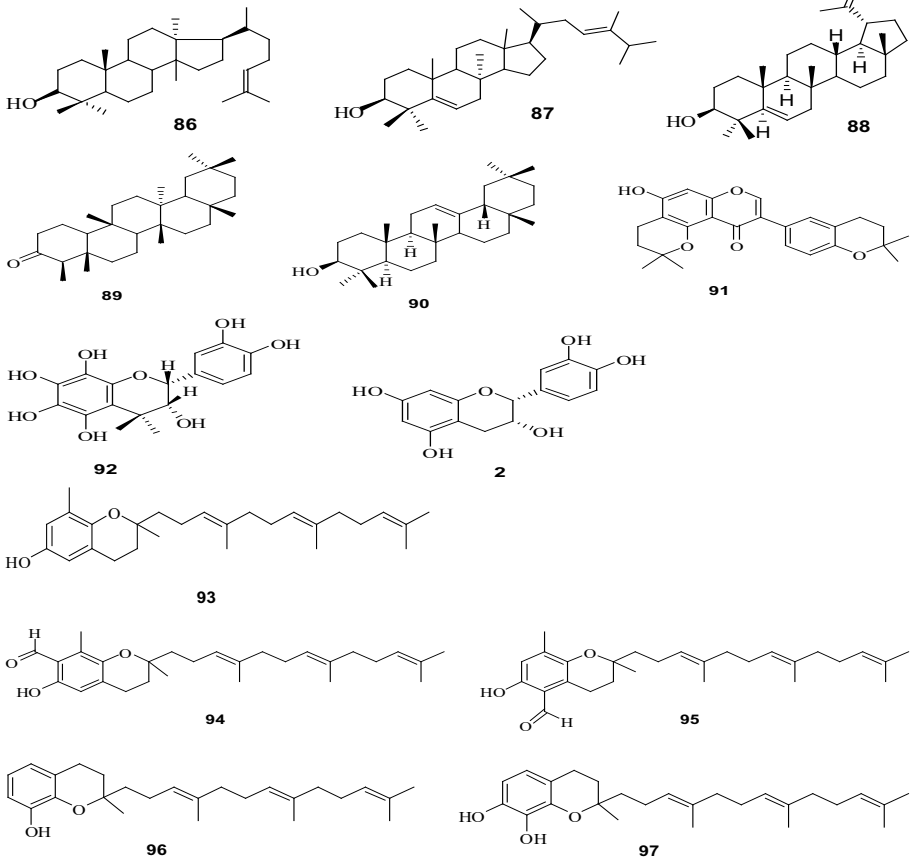
Selain santon dan benzofenon, dari tumbuhan *Garcinia* ditemukan senyawa golongan steroid, terpenoid, bifenil dan lain-lain yang dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Senyawa minor dari genus *Garcinia*

Kerangka	Senyawa	Tumbuhan	Pustaka
Steroid	Turukallol ( <b>86</b> )	<i>G. thwaitesii</i>	Gunatilaka <i>et al.</i> , 1983
	Stigmasterol ( <b>87</b> )	<i>G. bancana</i>	Rukachaisirikul <i>et al.</i> , 2005
Terpenoid	Lupeol ( <b>88</b> )	<i>G. thwaitesii</i>	Gunatilaka <i>et al.</i> , 1983
	Friedelin ( <b>89</b> )	<i>G. griffithii</i>	Lannang <i>et al.</i> , 2005
	<i>b</i> -amirin ( <b>90</b> )	<i>G. dulcis</i>	Deachatai <i>et al.</i> , 2005
Flavonoid	Dulcisisoflavan ( <b>91</b> )	<i>G. dulcis</i>	Deachatai <i>et al.</i> , 2005
	Dulcisisoflavan ( <b>92</b> )		
Flavan	(-)-Epikatekin ( <b>2</b> )		
Turunan Fenol lainnya	$\delta$ -Tokotrienol A ( <b>93</b> )	<i>G. virgata</i>	Merza <i>et al.</i> , 2004
	7 - Formil - $\delta$ - tokotrienol ( <b>94</b> )		
	5 - Formil - $\delta$ - tokotrienol ( <b>95</b> )		
	Parvifoliol E dan G ( <b>96-97</b> )	<i>G. parvifolia</i>	
			Rukachaisirikul <i>et al.</i> , 2006

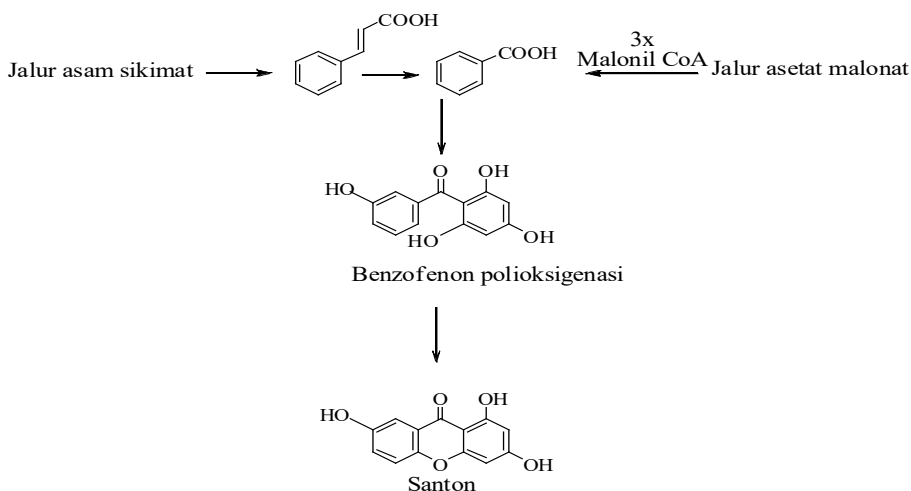


Senyawa lain dari genus *Garcinia* dari **86** sampai dengan **97** adalah sebagai berikut:



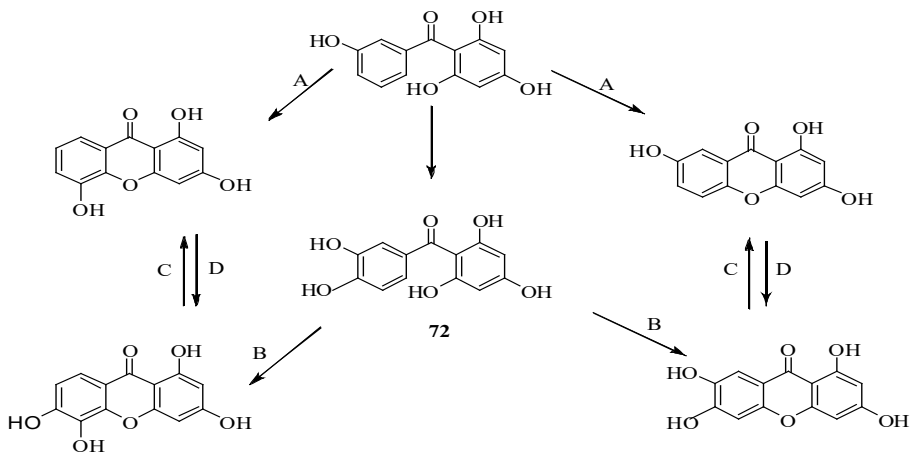
## 2.5 Biosintesis santon dan hubungannya dengan benzofenon

Biogenesis santon dengan pola yang karakteristik dari tumbuhan tingkat tinggi merupakan kombinasi dari dua jalur yaitu jalur asam shikimat, yang merupakan unit  $C_6C_1$  turunan fenilalanin (cincin B) dan asetat malonat (cincin A). Kedua unit ini akan bergabung membentuk polihidroksi benzofenon sebagai senyawa antara pada pembentukan santon. Dalam studi awal biosintesis santon dari famili Guttiferae dilaporkan bahwa asam sinamat, benzoat, *meta*-hidrobenzoat, malonat, dan bezofenon merupakan prekursor mangostin (**31**) dari *G. mangostana*. Jalur biosintesis tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3. Skema jalur biosintesis santon

Penggunaan benzofenon polioksigenasi (2,3',4,6-tetrahidrok sibenzofenon) kurang sesuai untuk prekursor *p*-substitusi. Sehingga biosintesis santon dari tumbuhan tingkat tinggi secara umum dipilih maklurin (**72**) sebagai prekursor. Kopling oksidatif dari polihidroksi benzofenon dapat memberikan 1,3,5-trihidroksi dan 1,3,7-trihidroksisanton (jalur A) dan maklurin (**72**) yang dibentuk melalui hidroksilasi pada posisi 4'-dari polihidroksi benzofenon. Kopling oksidatif dari maklurin menghasilkan 1,3,5,6- dan 1,3,6,7-tetrahidroksisanton (jalur B). Selain itu kopling oksidatif dapat terjadi melalui reduksi atau oksidasi inti sebagai contoh reduksi posisi C-6 dari 1,3,5,6-, dan 1,3, 6,7- tetrahidroksinasisanton menghasilkan 1,3,5- dan 1,3,7--trioksigenasisanton (jalur C). Selanjutnya santon 1,3,5,6- dan 1,3,6,7- tetrahidroksinasi dapat terbentuk melalui oksigenasi pada posisi 6 dari 1,3,5- dan 1,3,7-trihidroksisanton ( jalur D). Skema jalur biosintesis santon dengan prekursor maklurin (**72**) dapat dilihat pada Gambar 2.4 (Bennett and Lee, 1989).



Gambar 2.4. Skema jalur biosintesis santon dengan prekursor macklurin (72)

Oksidasi atau reduksi inti dari trioksigenasi santon adalah pola oksigenasi utama pada santon yang berasal dari famili Guttiferae, dimana pola oksigenasi khususnya 1,3,5-, 1,3,7-, 1,7-, 1,5-, dan 7- lebih mudah terbentuk dari bentuk polihidroksibenzofenon dibandingkan dengan macklurin. (72). Keikutsertaan benzofenon dalam biosintesis santon melalui empat pola oksigenasi yang berbeda yaitu 1,3,5-, 1,3,7-, 1,3,6,7-, dan 1,3,6,8-, menunjukkan bahwa bentuk ini dapat menjadi bentuk antara dalam biosintesis santon secara umum dari tumbuhan tingkat tinggi. Umumnya kopling oksidatif dari sejumlah hidroksilasi benzofenon sesuai untuk pola oksigenasi santon (Bennett and Lee, 1989).

Untuk prenilasi dari oksigenasi santon selalu ditemukan pada posisi *orto* terhadap fungsi oksigen. Prenilasi pada C-2 adalah paling umum, tetapi hanya ditemukan dalam bentuk C-1,C-3 dioksigenasi, yang menunjukkan gugus fenil menghambat reduksi dari gugus hidroksil pada C-3. Bentuk ini banyak ditemukan pada santon yang sederhana. Jenis monoprenilasi jarang terjadi pada C-4, C-8, atau C-7. Gugus prenil yang kedua umumnya terjadi pada posisi C-4, atau C-8. Diprenilasi C-2,C-4 umumnya terjadi pada trioksigenasi C-1,C-3,C-5-; C-1,C-3,C-7-; dan tetraoksigenasi C-1,C-3,C-5,C-6-, atau C-1,C-3,C-6,C-7-. Untuk diprenilasi C-2,C-8 terbatas pada pola trioksigenasi C-1,C-3,C-7 dan tetraoksigenasi.C-1,C-3,C-6,C-7 (Bennet and Lee, 1989).

## 2.6 Senyawa sitotoksik dari tumbuhan *Garcinia*

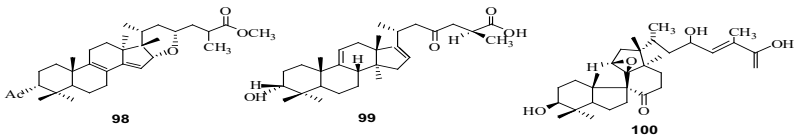
Beberapa spesies dari genus *Garcinia* dilaporkan mengandung senyawa sitotoksik terhadap sel kanker dengan menggunakan berbagai sel uji. Senyawa tersebut diantaranya adalah sebagai berikut

### 1. Senyawa golongan santon

Ito *et al.* (2003), melaporkan bahwa dari kulit batang *G. fusca* mengandung delapan senyawa santon yang memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel Raji. Senyawa yang paling potensial dari kedelapan senyawa tersebut adalah 7-*O*-metilgarsinon E (**55**) dengan nilai aktivitas penghambatan  $IC_{50}$  210 mol/32 pmol TPA.

### 2. Senyawa triterpen

Vieira *et al.* (2004), melaporkan penemuan senyawa sitotoksik golongan triterpen dari kulit batang *G. speciosa* yaitu friedolanostan A - D, lanostan A - B, dan abeo-lanostan, dimana memberikan aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker jenis MCF-7 dengan nilai  $GI_{50}$  2,7 - 26,4  $\mu$ M. Senyawa yang memiliki aktivitas yang tinggi adalah friedolanostan C (**98**) dengan nilai  $GI_{50}$  15,3  $\mu$ M, lanostan B (**99**)  $GI_{50}$  15,5  $\mu$ M, dan abeolanostan (**100**)  $GI_{50}$  18,7  $\mu$ M dengan pembanding doksorubisin  $GI_{50}$  0,043  $\mu$ M.

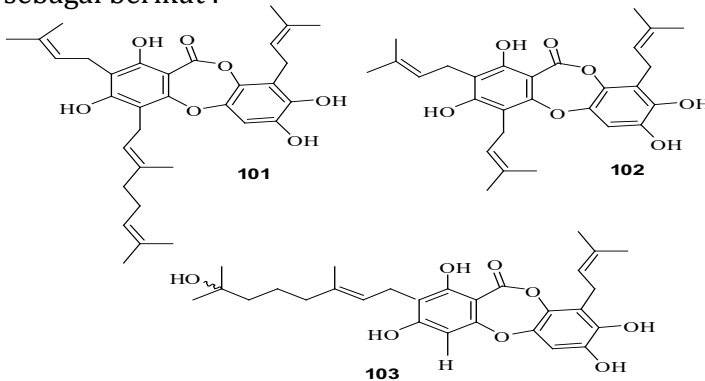


### 3. Senyawa golongan benzofenon

Senyawa golongan benzofenon yang mempunyai sifat sitotoksik adalah isogarsinol 13-*O*-metileter (**75**), garsinol 13-*O*-metileter (**77**), isogarsinol (**76**), garsinol (**78**), klusianon (**79**), dan maklurin (**72**) yang berasal dari ekstrak etanol kulit batang *G. assigu*. Uji aktivitasnya dilakukan terhadap sel Raji dengan induser *Epstein - Barr virus early atigen* (EBV-EA) secara *in vitro* terhadap 12-*O*-tetradekanoilforbol-13-asetat (TPA). Senyawa yang paling tinggi aktivitasnya ditunjukkan oleh senyawa garsinol (**78**) dan maklurin (**72**) seperti dilaporkan oleh Ito *et al.* (2003).

#### 4. Senyawa golongan depsidon

Xu *et al.* (2000), melaporkan senyawa sitotoksik golongan depsidon dari daun *G. parvifolia* dengan nama garsidepsidon A (**101**), B (**102**), dan C (**103**). Uji aktivitasnya dilakukan terhadap sel P-388 dengan ED<sub>50</sub> masing-masing 2,36; 2,42; dan 3,2 µg/mL. Struktur molekul senyawa tersebut adalah sebagai berikut :



### 2.7 Sitotoksik dan metode uji aktivitasnya

Dalam penelitian mencari senyawa antikanker atau antitumor, dikenal tiga istilah yaitu sitotoksik, antitumor, dan antikanker. Masing-masing mempunyai pengertian yang berbeda. Sitotoksik diartikan toksik terhadap sel. Pada pengertian ini berlaku untuk sel normal ataupun sel kanker. Antitumor adalah material termasuk senyawa yang memiliki efek terhadap suatu jenis tumor pada tingkat uji *in vivo*, dan antikanker adalah yang sudah menunjukkan aktivitasnya secara efektif melalui uji klinik (Gossel and Bricker, 1990). Sitotoksik merupakan aktivitas yang sangat erat hubungannya dengan aktivitas antineo-plasma, baik antitumor maupun antikanker. Pengujian sitotoksik dapat dilakukan dengan beberapa metode sebagai berikut.

#### 1. Metode sulforhodamin B (SRB)

Metode SRB adalah salah satu metode yang dikembangkan oleh *National Cancer Institute* (Vieira *et al.*, 2004). Metode ini berdasarkan pada terjadinya warna dari SRB apabila ditambahkan pada sel kanker. Sel yang telah siap uji sebanyak 190 mL ditambah dengan sampel uji sebanyak 10 mL, kemudian di-inkubasi selama 3-4 hari pada suhu 30 °C. Setelah itu sel difiksasi dengan TCA 50%. Pewarnaan menggunakan SRB 0,4% dalam asam asetat 1% selama

30 menit. Warna SRB yang tidak terikat dibilas dengan asam asetat 1% sedangkan yang terikat diekstraksi dengan basa tris (pH 10). Intensitas warna yang dihasilkan diukur dengan menggunakan ELISA *plate reader* pada  $\lambda_{\text{maks}}$  515nm. Persen viabilitas dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ viabilitas} = \frac{A_1 - A_0}{A_2 - A_0} \times 100\%$$

$A_0$  = absorban blanko

$A_1$  = absorban (sel + sampel)

$A_2$  = absorban kontrol (sel + 10% DMSO)

## 2. Metode *mikrokultur tetrazolium* (MTT)

Metode ini menggunakan reagen berupa garam tetrazolium, yaitu 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (Yang *et al.*, 2005). Pengujian ini ber-dasarkan kemampuan enzim reduktase mitokondria dehidrogenase yang dihasilkan oleh sel aktif untuk mengubah larutan garam tetrazolium menjadi suatu produk formazan yang tidak larut dalam air. Pada metode MTT dapat diketahui nilai  $IC_{50}$  (*Inhibiting Concentration 50*) serta tiga parameter lain yaitu  $GI_{50}$  (*Growth Inhibiting 50*), TGI (*Total Growth Inhibiting*) dan  $LC_{50}$  (*Lethal Concentration 50*) dari senyawa uji. Ketiga parameter ini ditentukan melalui kurva hubungan antara variasi konsentrasi uji dengan nilai % pertumbuhan sel yang diperoleh. Persentase pertumbuhan ditentukan oleh rumus :

$G$  = pertumbuhan sel

$A_c$  = Absorban kontrol

$A_0$  = absorban sel pada hari ke-0

$A_4$  = Absorban sel pada hari ke-4

## 3. Metode XTT

Metode pengujian aktivitas ini berdasarkan pembentukan formazan yang larut dalam air. Dalam metode ini digunakan pereaksi 2,3-bis-[2-metil-4-nitro-5-sulfonyl]-5-[(fenilamino) karbonil]-2H-tetrazolium hidroksida (Skehan *et al.*, 1990).

## 4. Metode tripan biru

Metode ini berdasarkan pada pewarnaan dengan menggunakan pereaksi tripan biru dan intensitas warna diukur dengan *haemocytometer*. Sel yang aktif akan terlihat bersinar dan sel yang mati berwarna biru gelap jika diamati di bawah mikroskop.

$$\%G = \frac{A_4 - A_0}{A_c - A_0} \times 100\%$$

5. Metode laktat dehidrogenasi ( LDH)

Metode ini berdasarkan pada aktivitas enzim laktat dehidrogenasi yang terkandung di dalam supernatan kultur sel.

## 2.8 Pemisahan dan pemurnian kandungan kimia *G. cowa*

Mahabusarakam *et al.* (2005) melaporkan bahwa dari ekstrak aseton getah *G. cowa* diperoleh kowagarsinon B-E (**24**, **104**, **65**, dan **66**) dan kowanin (**4**) menggunakan teknik pemisahan kromatografi kolom vakum dan gravitasi silika gel dengan eluen *n*-heksan, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, aseton, dan metanol. Panthong *et al.* (2006) melaporkan bahwa dari ekstrak *n*-heksan diperoleh kowasanton A, B, D dan E (**26**, **52**, **53**, dan **54**) dan kowanin (**4**), dengan teknik pemisahan yang sama seperti yang dilakukan oleh Mahabusarakam *et al.* (2005). Selanjutnya dari *G. cowa* dilaporkan adanya senyawa rubrasanton (Wahyuni *et al.*, 2004a-b). Teknik pemisahan dilakukan dengan metode kromatografi kolom vakum dan kromatografi radial dengan eluen *n*-heksan-EtOAc dengan polaritas bergradien.





# 3

## METODE PENELITIAN

### 3.1 Isolasi Kandungan Kimia dari Tumbuhan *Garcinia cornea* Roxb. dan *Garcinia cowa* Roxb. Serta Aktivitas Sitotoksik terhadap *Human Breast Cancer Cell Line T47D*

#### 3.2 Alat dan Bahan Penelitian

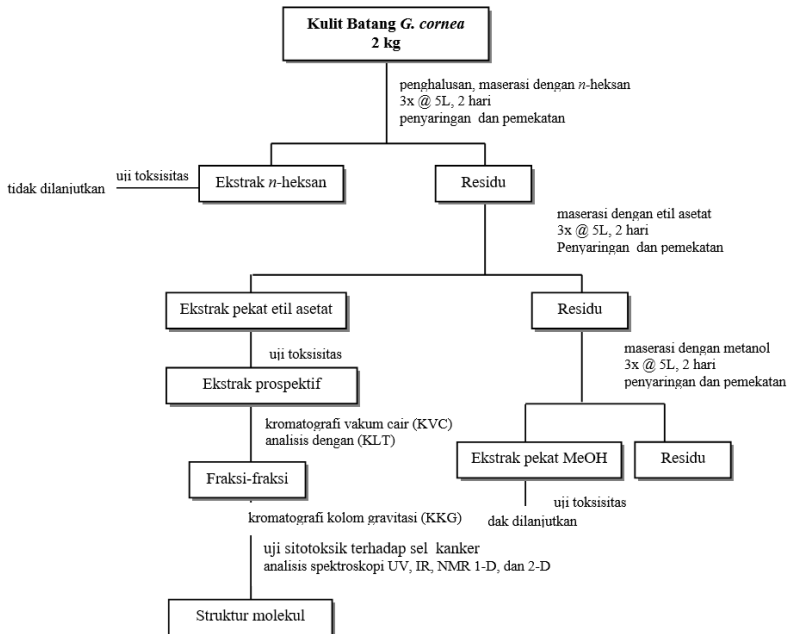
Di dalam penelitian ini dipergunakan berbagai alat gelas yang umum dipakai Laboratorium Kimia Organik serta alat penunjang lainnya seperti peralatan destilasi, *rotary evaporator*, lampu UV I<sub>maks<sup>254</sup></sub>, kolom kromatografi, *Fisher-John Melting Point Apparatus*, Spektrofotometer UV, IR (Shimadzu FTIR 8400), <sup>13</sup>C NMR, <sup>1</sup>H NMR (JEOL JNMECA-500), Spektrometer Massa (Mariner Biospektrometry), dan peralatan uji sitotoksik.

Bahan penelitian berupa sampel tumbuhan *G. cornea* dan *G. cowa* yang masing-masing dikumpulkan dari Kebun Raya Bogor, Jawa Barat, dan Hutan Sarasah Bonta Lembah Harau Payakumbuh, Sumatera Barat pada bulan April 2006. Sampel *G. cornea* telah diidentifikasi di Herbarium Bogoriensis Bogor, Jawa Barat dan *G. cowa* di Herbarium Anda, Universitas Andalas Sumatera Barat. Kedua spesimen telah disimpan di kedua herbarium tersebut.

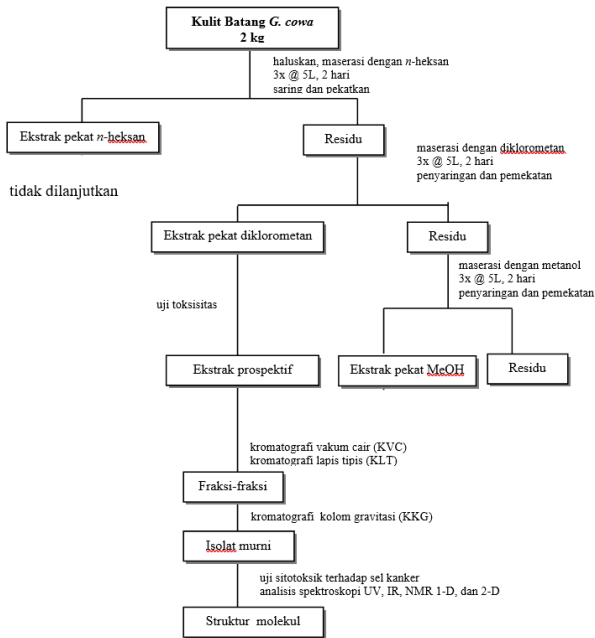
Bahan kimia yang dipergunakan terdiri atas berbagai pelarut organik antara lain: *n*-heksan, etil asetat, diklorometan, aseton, kloroform, metanol. Selain itu untuk pemisahan dan pemurnian dipergunakan silika gel E-Merck G60 GF<sub>254</sub> (230-400 mesh), GF<sub>254</sub> (70-230 mesh), plat KLT silika gel G60 GF<sub>254</sub> 0,25 mm, pereaksi penampak noda (Lampu UV/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Untuk pengujian aktivitas sitotoksik diantaranya digunakan dimetilsufoksida (DMSO), sulforhodamin B (SRB), asam tri-kloroasetat (TCA), asam asetat, basa tris [tris-(hidroksimetil) aminometan, *phosphate-buffered saline* (PBS), tripsin-EDTA (etilendiamin tetraasetat), dan media Dubelcco's *modified eagle medium* (DMEM).

### 3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian yang dilakukan adalah metode eksperimen di laboratorium yang terdiri atas tahap ekstraksi, isolasi, uji aktivitas, dan karakterisasi struktur senyawa aktif. Diagram alir penelitian disusun seperti tertera pada Gambar 3.1 dan Gambar 3.2.



Gambar 3.1. Diagram alir pemisahan dan pemurnian komponen kimia dari fraksi etil asetat kulit batang *G. cornea*



Gambar 3.2. Diagram alir pemisahan dan pemurnian komponen kimia dari fraksi *n*-heksan dan diklorometan kulit batang *G. cowa*

### 3.4 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian yang digunakan meliputi tahap persiapan sampel, ekstraksi, dan isolasi yang diuraikan sebagai berikut:

#### 3.4.1 Persiapan sampel

Kulit batang *G. cornea* dan *G. cowa* segar masing-masing sebanyak  $\pm 5$  kg dibersihkan, kemudian dipotong-potong tipis, dan dikeringkan pada ruang terbuka pada suhu kamar yang tidak terkena cahaya matahari langsung sampai berat konstan. Sampel kulit batang kering sebanyak 2 kg digiling halus (100 mesh).

#### 3.4.2 Ekstraksi kulit batang *G. cornea*

Sebanyak 2 kg serbuk kulit batang *G. cornea* dimaserasi selama dua hari dengan pelarut *n*-heksan tiga kali berturut-turut @ 5 L

menghasilkan maserat heksan. Selanjutnya residu dengan cara yang sama dimaserasi dengan etil asetat dan metanol untuk menghasilkan maserat etil asetat dan metanol. Masing-masing maserat yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* sehingga menghasilkan ekstrak kental *n*-heksan, etil asetat, dan metanol. Masing-masing ekstrak selanjutnya diisolasi dan dimurnikan dengan teknik kromatografi. Isolat murni yang diperoleh diuji toksisitasnya terhadap sel kanker payudara manusia T47D.

### **3.4.3. Ekstraksi kulit batang *G. cowa***

Sebanyak 2 kg serbuk kulit batang *G. cowa* dimaserasi dengan *n*-heksan tiga kali berturut-turut @ 5 L selama dua hari menghasilkan maserat *n*-heksan. Selanjutnya residu dengan cara yang sama dimaserasi dengan diklorometan dan metanol untuk menghasilkan maserat diklorometan dan metanol. Masing-masing maserat yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* sehingga menghasilkan ekstrak kental *n*-heksan, diklorometan, dan metanol.

Masing-masing ekstrak selanjutnya diisolasi dan dimurnikan dengan teknik kromatografi. Isolat murni yang diperoleh diuji toksisitasnya terhadap sel kanker payudara manusia T47D dengan metode SRB.

### **3.4.4. Pemisahan dan pemurnian senyawa dari fraksi etil asetat kulit batang *G. cornea***

Ekstrak etil asetat dianalisis dengan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan berbagai pelarut dalam mencari eluen yang tepat untuk kromatografi vakum cair (KVC). Ekstrak etil asetat (20 g) selanjutnya difraksinasi dengan KVC. Sampel disiapkan secara preadsorpsi dan dimasukkan ke dalam kolom kroma-tografi vakum (0,6 x 20 cm), dengan adsorben silika gel, kemudian dielusi dengan menggunakan eluen *n*-heksan, campuran *n*-heksan-EtOAc (9:1; 8:2; 7:3; 6:4, 5:5; 4:6, dan EtOAc) dengan masing masing eluen  $\pm 200$  mL. Fraksi hasil kromatografi yang mengandung noda yang dominan pada plat KLT diteruskan untuk dimurnikan dengan kromatografi kolom gravitasi (KKG). Pemantauan dilakukan dengan menggunakan plat KLT silika gel GF<sub>254</sub> dan pereaksi penampak noda asam sulfat 10% dalam etanol. Prosedur pemisahan fraksi-fraksi dan hasilnya dapat dilihat pada Bab IV Hasil dan Pembahasan.

### **3.4.5. Pemisahan dan pemurnian senyawa dari fraksi heksan kulit batang *G. cowa***

Ekstrak *n*-heksan (20 g) selanjutnya dipisahkan dengan kromatografi vakum cair (adsorben silika gel) dengan menggunakan eluen secara bergradien: *n*-heksan, campuran *n*-heksan EtOAc (9:1; 8:2; 7:3; 6:4) dan EtOAc @ 200 mL. Dari hasil kromatografi, fraksi yang mengandung noda yang dominan pada plat KLT diteruskan untuk dimurnikan dengan KKG. Pemantauan dilakukan dengan menggunakan plat KLT silika gel GF<sub>245</sub> di bawah lampu UV. Prosedur pemisahan fraksi-fraksi dan hasilnya dapat dilihat pada Bab IV Hasil dan Pembahasan.

### **3.4.6. Pemisahan dan pemurnian senyawa dari ekstrak diklorometan kulit batang *G. cowa***

Ekstrak diklorometan selanjutnya dipisahkan dengan kromatografi vakum cair (adsorben silika gel) menggunakan eluen secara bergradien *n*-heksan, campuran *n*-heksan dan EtOAc (9:1; 8:2; 7:3; 6:4), dan EtOAc. Selanjutnya dengan cara yang sama diteruskan untuk dimurnikan dengan KKG. Prosedur pemisahan fraksi-fraksi dan hasilnya dapat dilihat pada Bab IV Hasil dan Pembahasan.

### **3.4.7. Uji aktivitas sitotoksik terhadap senyawa hasil isolasi**

Terhadap senyawa hasil isolasi dilakukan pengujian aktivitas sitotoksik menggunakan sel kanker payudara manusia T47D dengan metode SRB (Vieira *et al.*, 2004). Prosedur uji terdiri atas tahap-tahap berikut.

#### **1. Persiapan sampel uji**

Sampel dilarutkan dengan DMSO sampai konsentrasi menjadi 4 mg/mL.

#### **2. Persiapan sel kanker**

Sel kanker yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel kanker payudara manusia T47D yang dikultur dalam DMEM dengan penambahan PBS 10 %, sel tersebut dikultur pada suhu 37 °C dengan kelembaban 100% dan kandungan CO<sub>2</sub> 5 % selama 3 hari sampai sel kultur tersebut mengalami konfluen 60 – 70 %. Setelah itu media lama dibuang, diganti dengan media baru dan diinkubasi kembali selama 24 jam. Sel kultur kemudian dicuci dengan PBS sebanyak 1 - 2 kali dan disuspensikan menggunakan larutan tripsin-EDTA. Sel yang telah tersuspensi ditambah media baru.

### 3. Bioassay

Sel yang telah siap uji sebanyak 190 mL ditambah dengan sampel uji sebanyak 10 mL kemudian diinkubasi selama 3 - 4 hari pada suhu 37 °C. Setelah itu sel difiksasi dengan TCA 50%. Pewarnaan dilakukan menggunakan SRB 0,4 % dalam asam asetat 1 % selama 30 menit. Warna SRB yang tidak terikat dibilas dengan asam asetat 1 % sedangkan yang terikat diekstraksi dengan basa tris (pH 10). Intensitas warna yang dihasilkan diukur dengan menggunakan ELISA *plate reader* pada  $\lambda_{maks}$  515 nm. Persen viabilitas dihitung berdasarkan persamaan sebagai berikut. fraksi

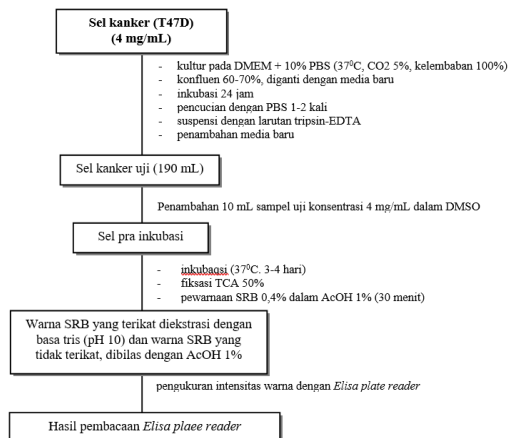
$$\% \text{ viabilitas} = \frac{A_1 - A_0}{A_2 - A_0} \times 100\%$$

$A_0$  = absorban blanko

$A_1$  = absorban (sel + sampel)

$A_2$  = absorban kontrol (sel + 10% DMSO)

Nilai  $IC_{50}$  dihitung dengan cara analisis regresi linear antara persen viabilitas dan konsentrasi (Skehan *et al*; 1990). Skema kerja uji sitotoksik dijelaskan pada gambar berikut.



Gambar 3.3. Skema kerja uji sitotoksik dengan metode SRB

### **3.4.8 . Karakterisasi senyawa hasil isolasi**

Karakterisasi senyawa hasil isolasi meliputi pemeriksaan sifat fisika yaitu titik leleh dan putaran optik serta analisis spektroskopi UV, IR,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, 1-D dan 2-D, serta MS.





# 4

## HASIL DAN PEMBAHASAN

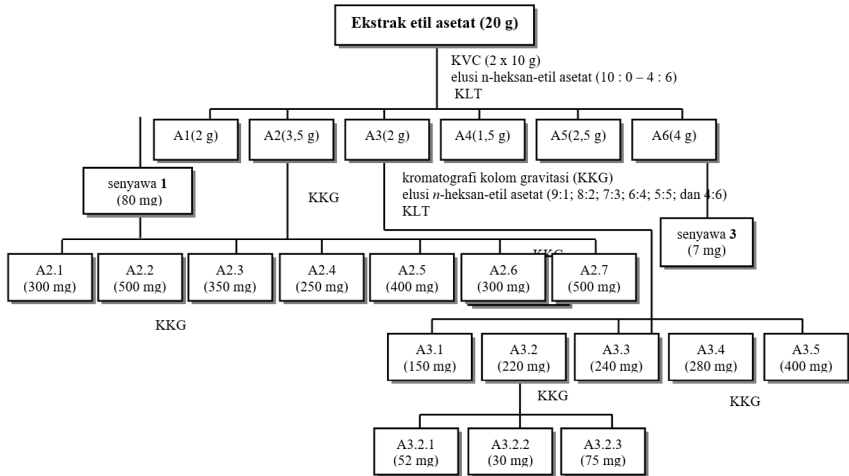
### 4.1. Ekstraksi Kulit Batang *G. cornea* dan *G. cowa*

Serbuk kering kulit batang *G. cornea* (2 kg) yang telah dimaserasi, secara bertingkat menghasilkan ekstrak kental *n*-heksan (30 g), etil asetat (60 g), dan metanol (300 g). Dengan cara yang sama serbuk kulit batang *G. cowa* menghasilkan ekstrak kental *n*-heksan (30 g), diklorometan (100 g), dan metanol (300 g). Dari data ini terlihat bahwa komponen yang bersifat polar lebih banyak dari semi polar dan polar.

### 4.2. Isolasi dan Pemurnian Senyawa dari Fraksi Etil asetat Kulit Batang *G. cornea*

Ekstrak etil asetat (20 g) dari kulit batang *G. cornea* dipisahkan dengan kromatografi vakum cair menghasilkan 6 fraksi gabungan A1 (2 g), A2 (3,5 g), A3 (2 g), A4 (1,5 g), A5 (2 g), dan A6 (3,5 g). Selanjutnya fraksi A2 (3,5 g) dipisahkan dengan metode kromatografi kolom gravitasi (KKG) menghasilkan 7 fraksi A2.1 (200 mg), A2.2 (500 mg), A2.3 (350 mg), A2.4 (250 mg), A2.5 (400 mg), A2.6 (300 mg), dan A2.7 (500 mg). Fraksi A2.2 (500 mg) kemudian dimurnikan dengan cara rekristalisasi dan diperoleh senyawa murni sebanyak 80 mg (senyawa **1**). Dari fraksi A3 (2 g) dengan cara yang sama menggunakan KKG diperoleh 5 fraksi A3.1 (150 mg), A3.2 (220 mg), A3.3 (240 mg), A3.4 (280 mg), dan A3.5 (400 mg). Selanjutnya fraksi A3.2 (220 mg) di KKG menghasilkan 3 fraksi A3.2.1 (52 mg), A3.2.2 (30 m, dan A3.2.3 (75 mg). Akhirnya dari fraksi A3.2.2 diperoleh senyawa **2** (10 mg), berupa kristal putih dengan t.l. 181-183 °C. Selanjutnya dari fraksi A3.4 (280 mg) dengan cara yang sama diperoleh senyawa **3** (7 mg).

Bagan isolasi dan pemurnian senyawa **1**, **2**, dan **3** dari fraksi etil asetat kulit batang *G. cornea* ditunjukkan pada Gambar 4.1.



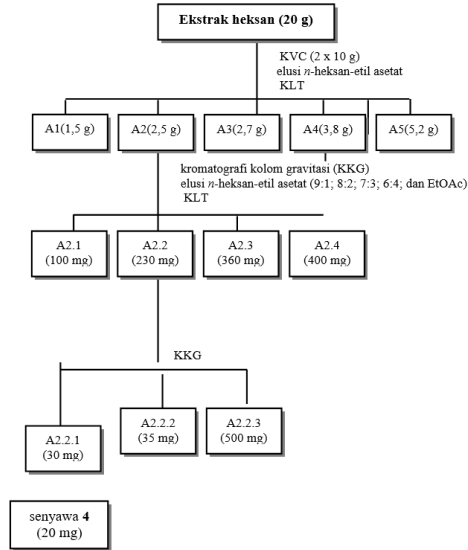
Gambar 4.1. Isolasi dan pemurnian senyawa 1, 2, dan 3 fraksi etil asetat kulit batang *G. cornea*

#### 4.3. Isolasi dan Pemurnian Senyawa dari Fraksi *n*-Heksan Kulit Batang *G. cowa*

Isolasi dan pemurnian senyawa dari kulit batang *G. cowa* dilakukan dengan metode kromatografi vakum cair (KVC) dan kromatografi kolom gravitasi. Sebanyak 20 g ekstrak *n*-heksan dari kulit batang *G. cowa* difraksinasi dengan cara KVC menghasilkan 5 fraksi gabungan yaitu A1 (1,5 g), A2 (2,5 g), A3 (2,7 g), A4 (3,8 g), dan A5 (5,2 g). Selanjutnya fraksi A2 (2,5 g) menghasilkan 4 fraksi A2.1 (100 mg), A2.2 (230 mg), A2.3 (360 mg), dan A2.4 (400 mg). Dari fraksi A2.2 (230 mg) dilakukan pemurnian dengan cara KKG menghasilkan 3 fraksi A2.2.1 (30 mg), A2.2.2 (35 mg), dan A2.2.3 (50 mg). Dari fraksi A2.2.1 diperoleh senyawa 4 (20 mg) berupa kristal kuning t.l. 136-137 °C.

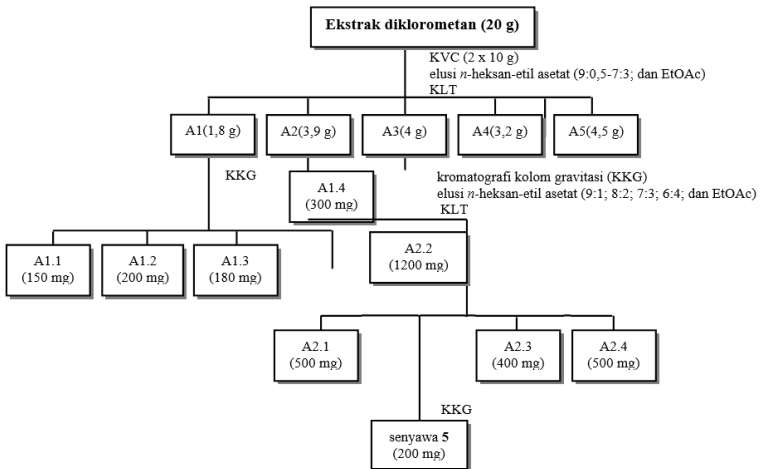
Fraksi diklorometan sebanyak 20 g difraksinasi dengan menggunakan KVC menghasilkan fraksi gabungan A1 (1,8 g), A2 (2,9 g), A3 (4 g), A4 (3,2 g), dan A5 (4,5 g). Fraksi A2 (3,9 g) dipisahkan dengan KKG dan diperoleh 4 fraksi A2.1 (500 mg), A2.2 (1200 mg), A2.3 (400 mg), dan A2.4 (500 mg). Fraksi A2.2 dimurnikan dengan cara rekristalisasi menghasilkan senyawa 5 (200 mg).

Bagan isolasi dan pemurnian senyawa 4 dari fraksi *n*-heksan kulit batang *G. cowa* terlihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2. Isolasi dan pemurnian senyawa 4 dari fraksi *n*-heksan kulit batang *G. cowa*

Bagan isolasi dan pemurnian senyawa 5 dari fraksi diklorometan kulit batang *G. cowa* terlihat pada Gambar 4.3.

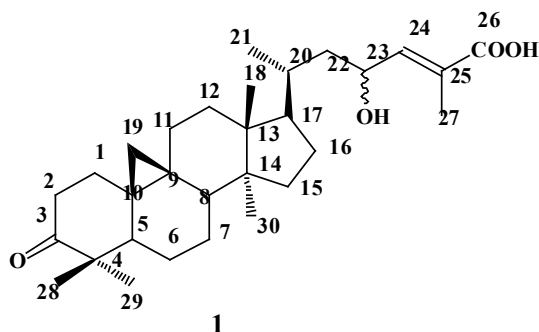


Gambar 4.3. Isolasi senyawa 5 dari fraksi diklorometan dari kulit batang *G. cowa*

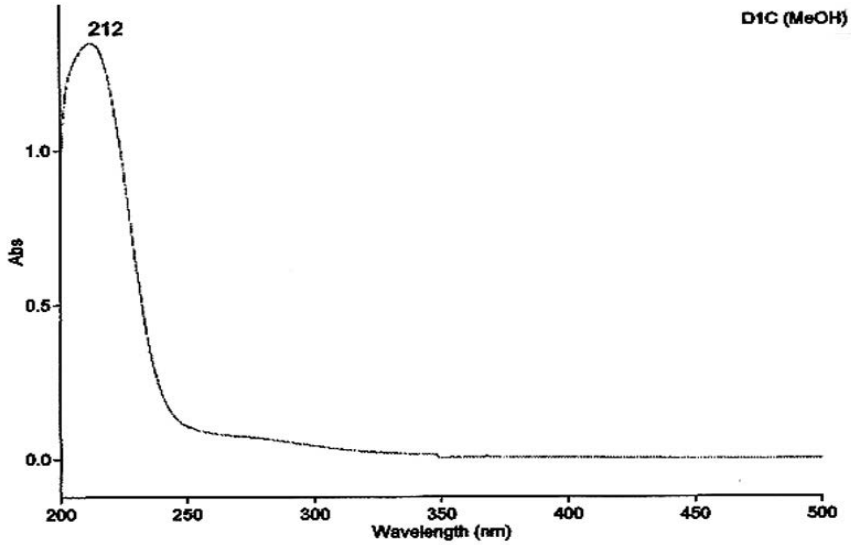
#### 4.4. Penentuan Struktur

Penentuan struktur senyawa hasil isolasi dilakukan dengan metode spektroskopi meliputi spektroskopi ultraviolet (UV), infra merah (IR), *nuclear magnetic resonance* (NMR) 1-dimensi (1-D) yang terdiri atas  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, DEPT, NMR 2-D (HMQC, HMBC), dan spektroskopi mass (MS). Spektrum DEPT memberikan informasi jenis karbon (C, CH,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ), HMQC digunakan untuk mengidentifikasi sinyal karbon yang mengikat H, spektrum HMBC memperlihatkan korelasi antara karbon dengan proton melalui dua atau tiga ikatan.

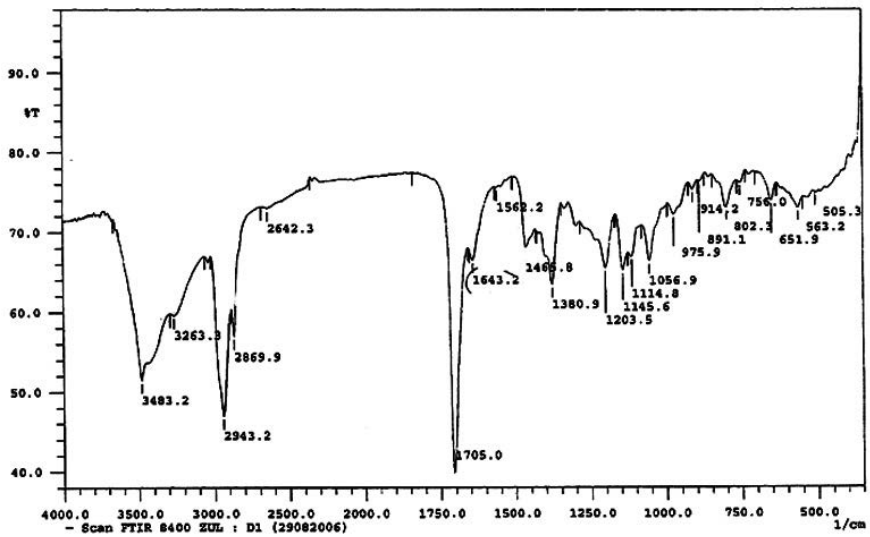
##### 4.4.1. Penentuan struktur senyawa 1 dari fraksi etil asetat kulit batang *G. cornea*



Senyawa **1** berupa padatan putih dengan t.l. 181-183 °C dan  $[\alpha]_D^{29}$  23,1 (c. 1, MeOH). Spektrum UV (Gambar 4.4) menunjukkan ciri khas senyawa golongan triterpenoid. Spektrum UV hanya menunjukkan satu serapan maksimum pada  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 212 (5,80) yang merupakan serapan untuk C=C ikatan rangkap yang terkonyugasi dengan gugus karbonil. Spektrum IR (Gambar 4.5) menunjukkan serapan maksimum ( $n_{\text{maks}}$   $\text{cm}^{-1}$ ) untuk gugus hidroksil pada (3483), C-H alifatik (2943, 2869), karbonil C=O asam (1705), dan C=O keton (1643).

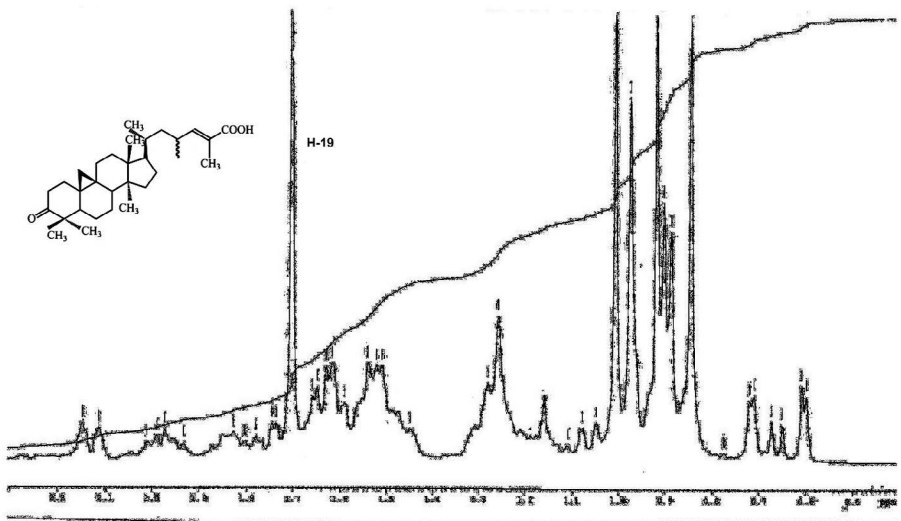


Gambar 4.4. Spektrum UV asam 3-okso 23-hidroksisikloart-24-en-26-oat (**1**) dalam MeOH



Gambar 4.5. Spektrum IR asam 3-okso 23-hidroksisikloart-24-en-26-oat (**1**)

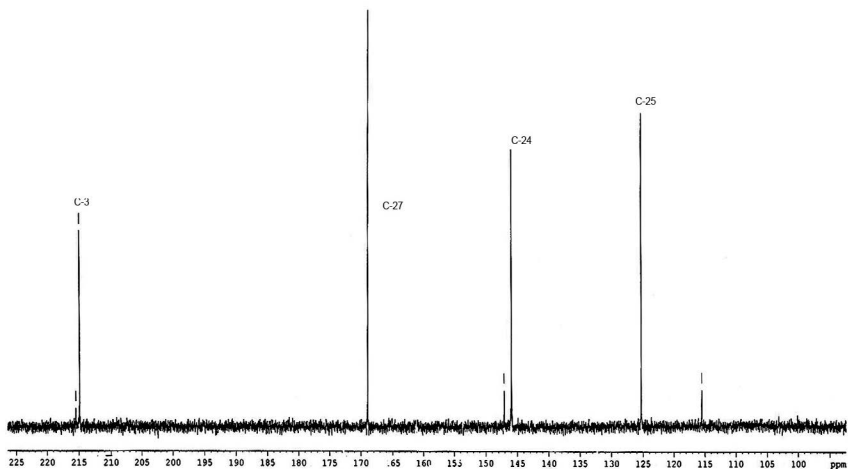
Pada spektrum  $^1\text{H}$  NMR terlihat pola sinyal yang khas untuk triterpenoid, dimana terlihat sinyal-sinyal yang berdempet pada daerah di bawah 3 ppm untuk karbon alifatik. Pada spektrum terlihat adanya sinyal pada  $\delta_{\text{H}}$  0,60 dan 0,61 ppm yang karakteristik untuk proton metilen dari siklopropan, metil vinilik pada  $\delta_{\text{H}}$  1,70 (s), dan lima sinyal metil lainnya pada  $\delta_{\text{H}}$  0,84 (s); 0,90 (*d*,  $J = 6,4$ ) merupakan proton metil yang mengalami kopling visinal dengan satu proton tetangga; 0,92 (s); 0,97 (s); dan 1,06 (s) ppm. (Gambar 4.6). Selain itu juga terlihat sinyal untuk proton olefinik sebagai sinyal *doblet* pada  $\delta_{\text{H}}$  6,55 (1H, *d*,  $J = 8$ ) pada H-24 yang terkopling dengan H pada C-23 terlihat pada Gambar 4.6 tertera pada Lampiran 1.



Gambar 4.6. Penggalan spektrum  $^1\text{H}$  NMR asam3-okso-23-hidroksisikloart-24-en-26-oat (**1**) untuk proton metilen dari siklopropan pada  $\delta_{\text{H}}$  1,70 (H-19), dan lima proton metil  $\delta_{\text{H}}$  0,84; 0,90; 0,92; 0,97; dan 1,06 ppm

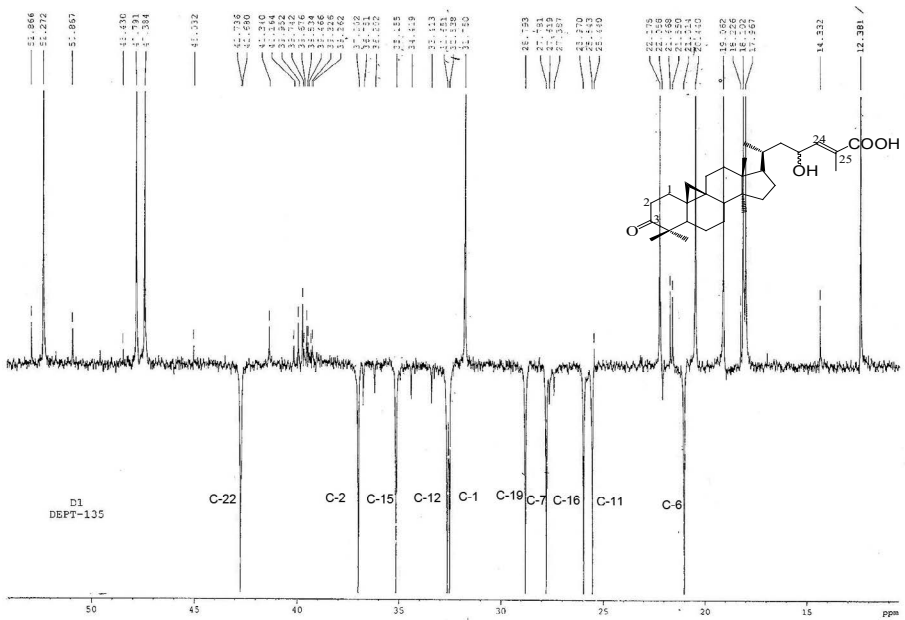
Pada spektrum  $^{13}\text{C}$  NMR terlihat adanya 30 sinyal yang memperkuat bahwa senyawa hasil isolasi adalah golongan triterpenoid. Sinyal-sinyal karakteristik muncul pada  $\delta_{\text{C}}$  214,9 (C-3) ppm untuk karbonil dalam bentuk sikloheksanon, dan karbonil pada rantai alifatik pada  $\delta_{\text{C}}$  169,0 (C-26) ppm serta terlihat adanya satu ikatan rangkap untuk sinyal karbon pada  $\delta_{\text{C}}$  146,0 (C-24) dan  $\delta_{\text{C}}$  125,3

(C-25) ppm, seperti terlihat pada Gambar 4.7. Data spektrum  $^1\text{H}$  NMR dan  $^{13}\text{C}$  NMR untuk senyawa **1** tertera pada Tabel 4.1. Penggalan spektrum pada daerah  $\delta_{\text{C}}$  12,0 – 38,0 ppm (Lampiran 2) dan  $\delta_{\text{C}}$  39,0 – 65,0 ppm (Lampiran 3).



Gambar 4.7. Penggalan spektrum  $^{13}\text{C}$ -NMR asam 3-okso-23-hiroksisikloart-24-en-26-oat (**1**) untuk karbon pada  $\delta_{\text{C}}$  214,9 (C-3), 169,0 (C-26), 146,0 (C-24), dan 125,3 (C-25)

Pada spektrum DEPT terlihat adanya enam sinyal metil pada  $\delta_{\text{C}}$  12,4 (C-27); 18,0 (C-18); 18,1 (C-21); 19,1 (C-30); 20,4 (C-28); 22,2 (C-29); sepuluh sinyal  $\text{sp}^2$  yaitu pada  $\delta_{\text{C}}$  21,0 (C-6); 25,5 (C-11); 26,0 (C-16); 42,7 (C-22); 27,8 (C-7); 28,8 (C-19); 32,5 (C-1); 32,7 (C-12); 35,2 (C-15); 37,0 (C-2) ppm, tujuh sinyal CH pada  $\delta_{\text{C}}$  31,8 (C-20); 47,4 (C-8); 47,8 (C-5); 52,3 (C-17); 64,4 (C-23); 125,3 (C-25); dan 146,0 (C-24) dan tujuh karbon kuartener pada 20,5 (C-9); 25,5 (C-11); 45,0 (C-13); 48,4 (C-14); 49,5 (C-4); 169,0 (C-27); dan 214,9 (C-3), seperti terlihat pada Gambar 4.8. Spektrum DEPT 90 dari senyawa **1** untuk karbon pada daerah 110,0 – 220,0 ppm dapat dilihat pada Lampiran 4.



Gambar 4.8. Spektrum DEPT 135 dari asam 3-okso-23-hidroksisikloart-24-en-26- oat (**1**)

Tabel 8. Data geseran kimia karbon dari spektrum  $^{13}\text{C}$  NMR asam 3-okso 23-hidroksisikloart-24-en-26-oat (**1**) pada 120 MHz dalam  $\text{DMSO-}d_6$  dan pembeding ( $1^*$ )

Posisi	$\delta_c$ (ppm)	$\delta_c$ ( $ppm_1^*$ )	DEPT
1	32,5	33,4	$\text{CH}_2$
2	37,0	37,4	$\text{CH}_2$
3	214,9	216,6	C
4	49,5	50,2	C
5	47,8	48,4	CH
6	27,0	21,5	$\text{CH}_2$
7	27,8	28,2	$\text{CH}_2$
8	47,4	47,7	CH
9	20,5	21,0	C

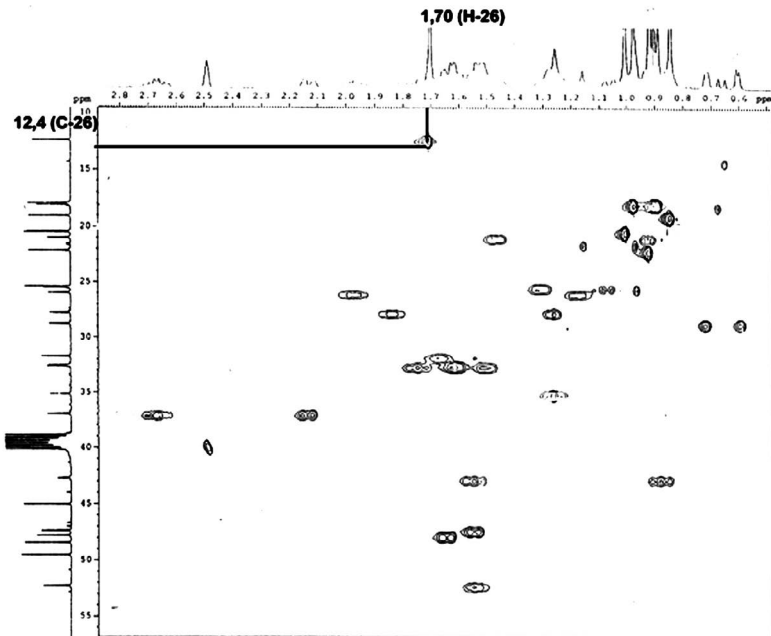


10	25,4	26,0	C
11	25,5	25,6	CH <sub>2</sub>
12	32,7	32,8	CH <sub>2</sub>
13	45,0	45,3	C
14	48,4	48,8	C
15	35,2	35,4	CH <sub>2</sub>
16	26,0	26,7	CH <sub>2</sub>
17	52,3	52,7	CH
18	18,0	18,0	CH <sub>3</sub>
19	28,8	29,5	CH <sub>2</sub>
20	31,8	31,8	CH
21	18,7	18,3	CH <sub>3</sub>
22	42,7	38,7	CH <sub>2</sub>
23	64,4	69,0	CH
24	146,0	142,1	CH
25	125,3	128,2	C
26	169	12,5	CH <sub>3</sub>
27	12,4	172,5	C
28	20,4	18,1	CH <sub>3</sub>
29	22,2	25,8	CH <sub>3</sub>
30	19,1	20,8	CH <sub>3</sub>

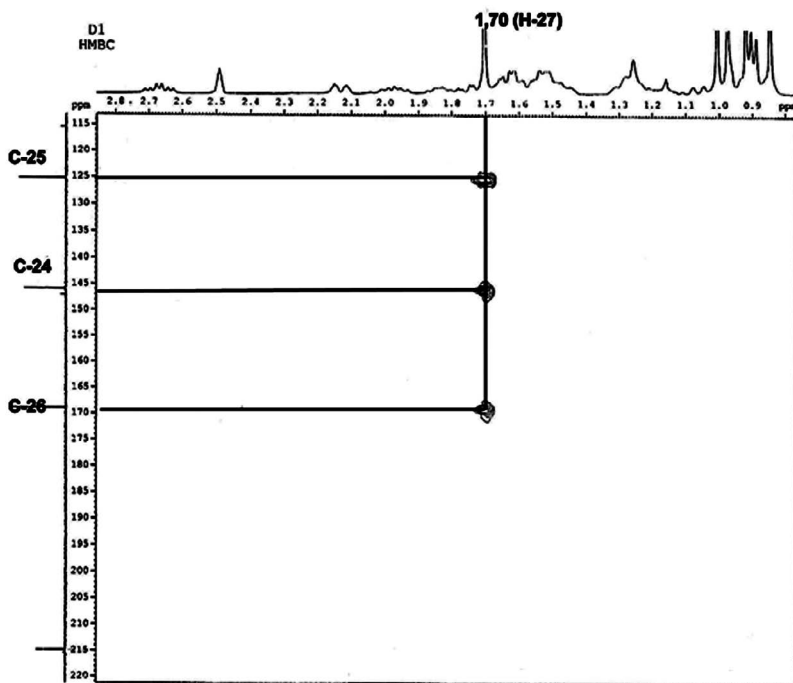
\* Ajaneyulu *et al.*, 1999

Dari data di atas terlihat bahwa senyawa **1** menunjukkan kemiripan nilai geseran kimia dengan senyawa pembanding asam 3-okso-23-hidroksisikloart-24-en-26-oat, namun terdapat sedikit perbedaan. Hal ini diduga karena pengaruh pelarut yang mana senyawa **1** diukur dalam DMSO sedangkan senyawa pembanding diukur dalam CDCl<sub>3</sub>. Selanjutnya ditunjang dengan data fisika t.l senyawa **1** 181-183 °C dan t.l. senyawa pembanding 185-186 °C yang menunjukkan nilai hampir sama dan putaran optik [α]<sub>D</sub><sup>29</sup> 23,1 ° (c. 1, MeOH) dan pembanding 18,7 ° (c. 1,16, CDCl<sub>3</sub>). Hal ini memperkuat usulan bahwa senyawa **1** adalah asam 3-okso-23-hidroksisikloart-24-en-26-oat, yang telah pernah dilaporkan dari *Mangivera indica*

(Ajaneyulu *et al.*, 1999). Selanjutnya untuk memastikan posisi gugus COOH berada pada C-26 dapat dilihat dari spektrum HMBC. Pada spektrum HMBC (Gambar 4.9) terlihat korelasi melalui tiga ikatan antara proton pada  $d_H$  1,70 ppm (C-27) dengan karbon pada  $d_C$  169,0 (C-26) yang merupakan atom C karbonil dan karbon pada  $d_C$  125,5 (C-25) dan 146,0 (C-24). Pada spektrum HMQC (Gambar 4.10) terlihat proton  $d_H$  1,70 ppm (C-27) terikat pada karbon  $d_C$  12,4 (C-27). Hal ini memperkuat dugaan bahwa gugus COOH terletak pada posisi C-26.



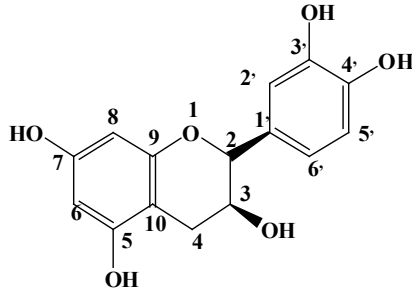
Gambar 4.9. Penggalan spektrum HMQC asam 3-okso-23-hidroksisikloart-24-en-26- oat (**1**) untuk daerah proton pada  $d_H$  0,40-2,80 ppm dengan karbon pada  $d_C$  10,0-55,0 ppm



Gambar 4.10. Penggalan spektrum HMBC asam 3-okso-23-hidroksisikloart-24-en-26- oat (**1**) untuk daerah proton pada  $d_H$  0,90 - 2,80 ppm dengan karbon pada  $d_C$  115,0 - 220,0 ppm

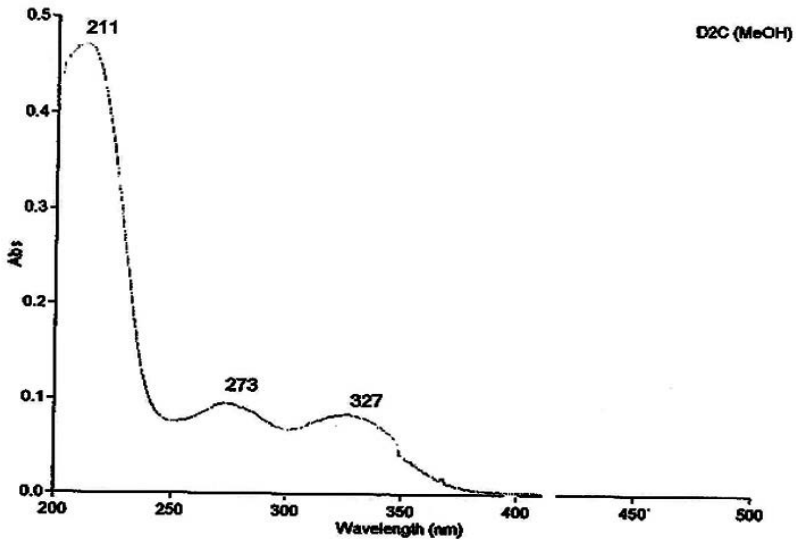
Berdasarkan analisis data spektroskopi UV, IR, dan NMR maka disimpulkan senyawa **1** adalah asam 3-okso-23-hidroksisikloart-24-en-26- oat, dengan rumus molekul  $C_{30}H_{48}O_4$  dengan BM = 470. Data MS terlampir pada Lampiran 5.

#### 4.4.2. Penentuan struktur senyawa 2 dari fraksi etil asetat kulit batang *G. cornea*

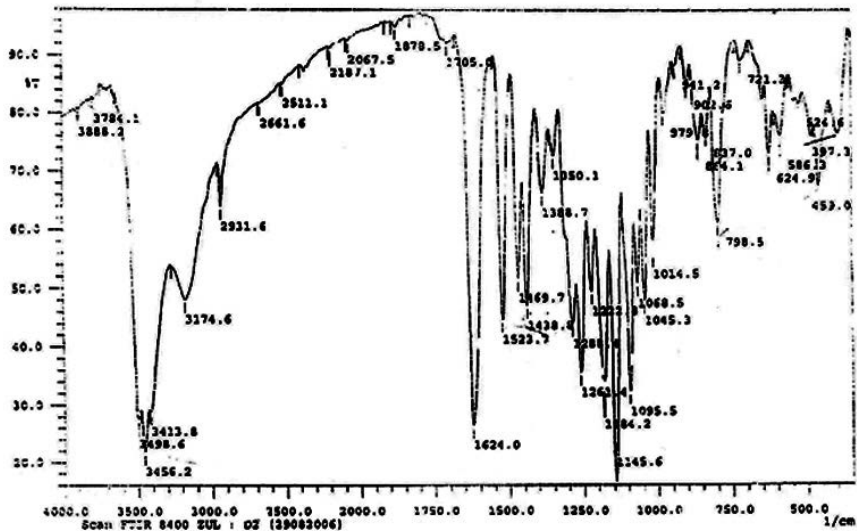


2

Senyawa 2 diperoleh berupa kristal putih dengan t.l. 239-240 °C dan  $[\alpha]_D^{25} -66$ . Spektrum UV (MeOH) menunjukkan serapan maksimum pada  $\lambda_{\text{maks}}$  ( $\log \epsilon$ ) nm: 211 (5,14), 273 (4,44), dan 327 (4,39) yang karakteristik untuk senyawa golongan flavonoid (Gambar 4.11).



Gambar 4.11. Spektrum UV untuk (-)- epikatekin (2) dalam MeOH



Gambar 4.12. Spektrum IR (-)- epikatekin (**2**)

Spektrum IR (Gambar 4.12) memperlihatkan adanya pita-pita serapan ( $n_{\text{maks}} \text{ cm}^{-1}$ ) untuk gugus hidroksil (3456), C-H aromatik (3174), C=C terkonyugasi dari cincin benzen (1624, 1523, dan 1469), C-O eter (1145) dan *orto* substitusi pada aromatik. Data spektrum UV dan IR menunjukkan ciri khas senyawa golongan flavonoid jenis flavan (Markham and Ternai, 1976). Data  $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$  NMR dari (-)-epikatekin (**2**) ditunjukkan pada Tabel 9.

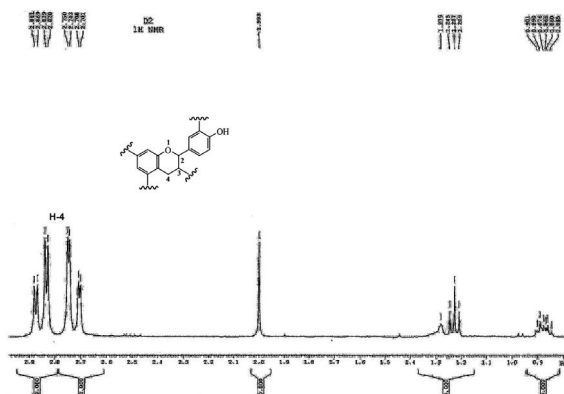
Tabel 9. Data geseran kimia proton dan karbon dari spektrum  $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$  NMR dari (-)- epikatekin (**2**) pada 400 MHz untuk  $^1\text{H}$  dan 100 MHz untuk  $^{13}\text{C}$  dalam metanol- $d_4$  serta (-)- epikatekin (**2\***) pembanding

Posisi	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), integrasi, multiplisitas, J(Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm), $\frac{\delta_{\text{C}}}{2}$	$\delta_{\text{C}}$ (ppm), ( <b>2*</b> )	DEPT
1				
2	84,80 (1H, br, s)	79,9	78,1	CH
3	4,17 (1H, br, s)	67,5	65,1	CH
4	2,8 (2H, m)	29,2	28,0	CH <sub>2</sub>
5		158,0	156,4	C

6	5,93 (1H, <i>d</i> , 3,0)	95,9	95,6	CH
7		157,7	156,3	C
8	5,90 (1H, <i>d</i> , 3,0)	96,4	94,5	CH
9		157,4	155,7	C
10		100,1	98,8	C
1'		132,3	130,7	C
2'	6,79 (1H, <i>d</i> , 2,0)	119,4	118,1	CH
3'		145,9	144,6	C
4'		145,8	144,5	C
5'	6,96 (1H, <i>d</i> , 10,5)	115,9	115,0	CH
6'	6,75 (1H, <i>dd</i> , 10,5; 2,0)	115,3	118,1	CH

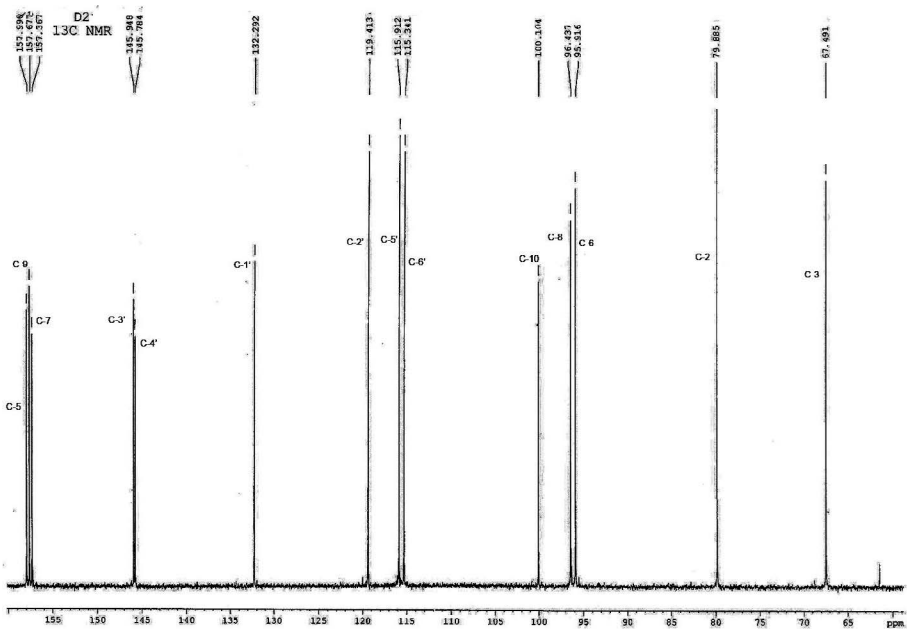
\* Markham and Ternai (1976)

Dari spektrum  $^1\text{H}$  NMR (Gambar 4.13) terlihat adanya sinyal pada  $\delta_{\text{H}}$  2,8 (2H, *m*) yang merupakan sinyal dari gugus metilen, hal ini dapat dilihat pada Gambar 4.13. Tiga sinyal proton aromatik pada  $\delta_{\text{H}}$  6,75 (1H, *s*,  $J = 10,5$ ); 6,96 (1H, *d*,  $J = 2,0$ ); dan 6,79 (1H, *dd*,  $J = 2,0$ ), yang mengalami kopling *orto* dan *meta* menunjukkan adanya cincin trisubstitusi aromatik (Lampiran 6). Selain itu juga terlihat sinyal untuk dua proton aromatik pada cincin lainnya yang terkopling *meta* pada  $\delta_{\text{H}}$  5,93 (1H, *d*,  $J = 3,0$ ) dan 5,90 (1H, *d*,  $J = 3,0$ ) dan sinyal untuk dua proton metin pada 4,80 (1H, *br s*) dan 4,17 (1H, *br s*) terlihat pada Lampiran 7.

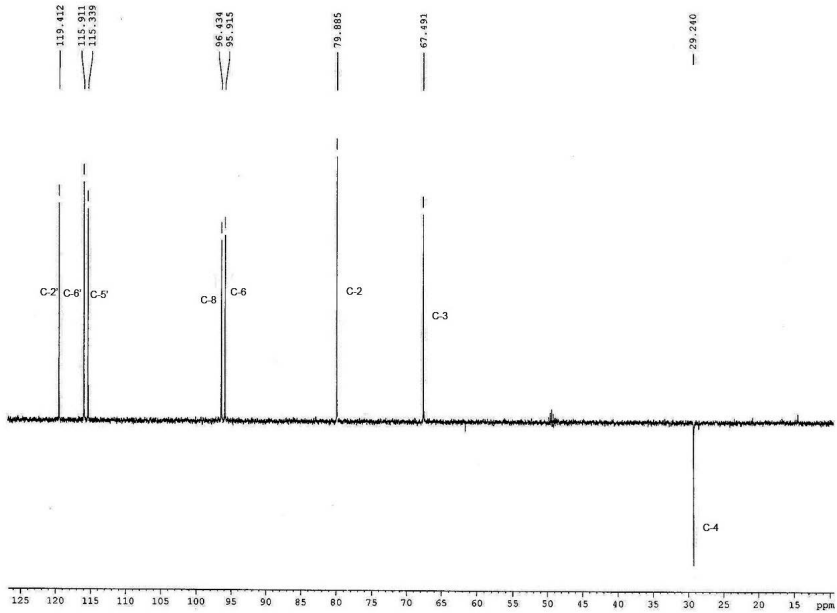


Gambar 4.13. Penggalan spektrum  $^1\text{H}$  NMR (-)- epikatekin (**2**) untuk proton pada  $\delta_{\text{H}}$  2,80 (2H, *m*) (C-4)

Analisis terhadap spektrum  $^{13}\text{C}$  NMR dalam metanol- $d_4$  (Gambar 4.14) menunjukkan adanya 15 sinyal karbon, dan tidak adanya sinyal untuk C karbonil yang khas untuk senyawa flavonoid tipe flavan. Spektrum DEPT (Gambar 4.15) menunjukkan adanya satu sinyal metilen ( $\text{CH}_2$ ) pada  $\delta_c$  29,2 (C-4); tujuh sinyal metin ( $\text{CH}$ ) pada  $\delta_c$  67,5 (C-3); 79,9 (C-2); 95,9 (C-6); 96,4 (C-8); 119,4 (C-6'); 115,9 (C-5'); dan 115,3 (C-2') ppm, dan tujuh sinyal C kuartener pada  $\delta_c$  100,1 (C-10); 132,3 (C-1'); 145,8 (C-4'); 145,9 (C-3'); 157,4 (C-9); 157,7 (C-7); dan 158,0 (C-5) ppm. Spektrum DEPT 90 dari senyawa **2** untuk karbon pada daerah 60,0 -130,0 ppm dapat dilihat pada Lampiran 8.



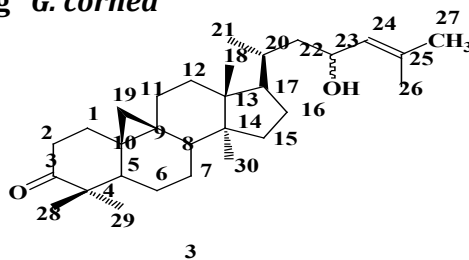
Gambar 4.14. Penggalan spektrum  $^{13}\text{C}$  NMR (-)- epikatekin (**2**) untuk karbon pada  $\delta_c$  67,5 - 160,0 ppm



Gambar 4.15. Penggalan spektrum DEPT 135 untuk (-)- epikatekin (2)

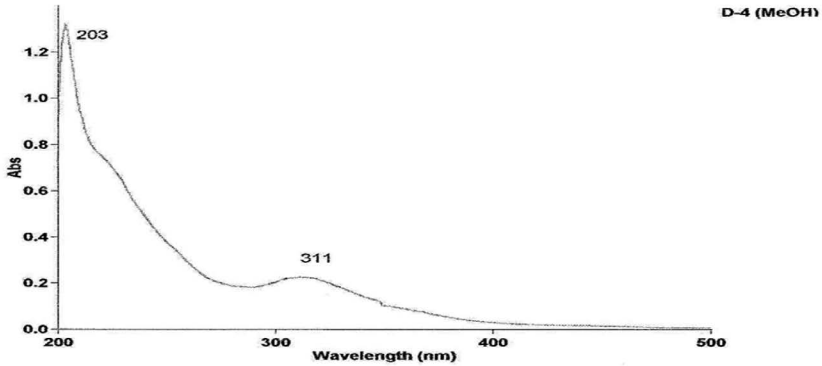
Analisis  $^{13}\text{C}$  NMR terhadap senyawa hasil isolasi menunjukkan kesesuaian parameter yang tinggi dengan data  $^{13}\text{C}$  NMR untuk (-)-epikatekin yang telah dilaporkan dalam pustaka seperti terlihat pada Tabel 5 (Markham and Ternai, 1976). Berdasarkan analisis data UV, IR  $^1\text{H}$  NMR dan  $^{13}\text{C}$  NMR serta dengan membandingkan data tersebut dengan yang telah dilaporkan dalam pustaka maka disimpulkan bahwa senyawa **2** adalah (-)-epikatekin dengan rumus molekul  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$  dan berat berat molekul 204.

#### 4.4.3. Penentuan struktur senyawa 3 dari fraksi etil asetat kulit batang *G. cornea*

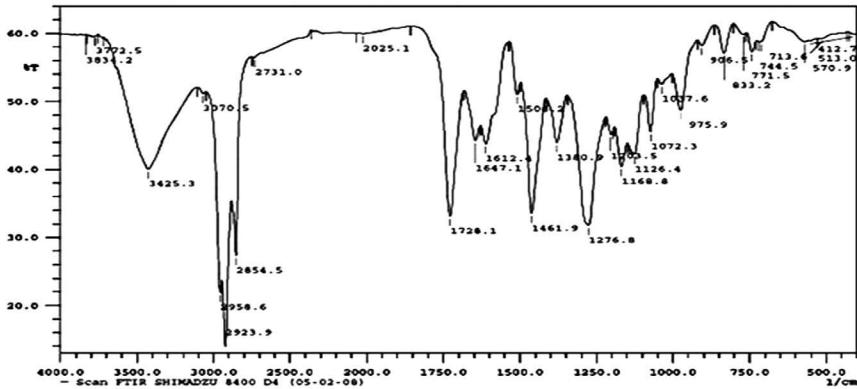




Spektrum UV (Gambar 4.16) menunjukkan ciri khas senyawa golongan triterpenoid. Spektrum UV hanya menunjukkan satu serapan maksimum pada  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 311 (5,80) yang merupakan serapan untuk n - p\*. Spektrum IR (Gambar 4.17) menunjukkan serapan maksimum pada ( $\nu_{\text{maks}}$   $\text{cm}^{-1}$ ) untuk gugus hidroksil (3435), C-H alifatik ( 2923, 2954, dan 2954), dan karbonil (1726).



Gambar 4.16. Spektrum UV 3-okso-sikloart-24-en-23-ol (**3**)

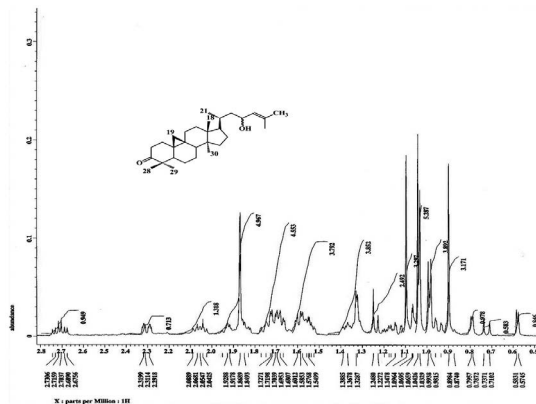


Gambar 4.17. Spektrum IR 3-okso-sikloart-24-en-23-ol (**3**)

Spektrum  $^1\text{H}$  NMR dan  $^{13}\text{C}$  NMR dari senyawa **3** menunjukkan adanya kemiripan dengan spektrum  $^1\text{H}$  NMR dan  $^{13}\text{C}$  NMR senyawa **1** namun terlihat sedikit perbedaan. Pada spektrum  $^1\text{H}$  NMR senyawa **3** terlihat adanya tujuh sinyal yang khas untuk proton metil yaitu pada 0,89 (3H, s); 0,99 (3H, d,  $J = 6,2$ ); 1,03 (3H, s); 1,04 (3H, s); 1,07 (3H,

s); 1,87 (3H, s); dan 1,33 (Gambar 4.18). Selain itu juga terlihat sinyal yang khas untuk proton dari siklopropan pada daerah  $\delta_H$  0,58 ppm (C-19), ( Gambar 4.18). Pada spektrum  $^{13}C$  NMR terlihat adanya 30 sinyal atom karbon yang khas untuk senyawa golongan triterpenoid, yang dapat dilihat pada Gambar 4.19. Sinyal yang muncul pada  $\delta_C$  219,6 ppm merupakan sinyal yang khas untuk C karbonil, sedangkan sinyal pada  $\delta_C$  146,5 ppm dan  $\delta_C$  126,6 ppm merupakan sinyal yang khas untuk C  $sp^2$  (senyawa mempunyai satu ikatan rangkap). Pada spektrum DEPT terlihat adanya tujuh sinyal  $CH_3$  pada  $\delta_C$  (ppm) 12,6 (C-26); 18,2 (C-18); 18,3 (C-21); 19,3 (C-30); 20,9 (C-28); 22,3 (C-29); dan 32,5 (C-27) ppm, sepuluh sinyal  $CH_2$  pada 29,6 (C-19); 25,9(C-26); 26,8 (C-60); 28,4 (C-11); 29,8 (C-7); 32,9 (C-1); 33,6 (C-12); 35,6 (C-15); 37,6 (C-2); dan 43,0 (C-22), enam sinyal CH pada  $\delta_C$  21,2 (C-9); 33,0 (C-20); 45,7 (C-13); 48,0 (C-5); 48,6 (C-8); dan 52,9 (C-17); dan tujuh C kwatener pada  $\delta_H$  (ppm) 26,1 (C-10); 49,0 (C-4); 49,2 (C-14); 66,5 (C-23); 126,6, (C-25); 146,5 (C-24); dan 216,9 (C-3), yang dapat dilihat pada Gambar 4.20.

Sinyal ini menunjukkan adanya kemiripan dengan asam 3-okso-23-hidroksisikloart-24-en-26-oat yang telah dibahas sebelumnya (Anjaneyulu *et al.*, 1999) seperti terlihat pada Tabel.10 yang juga merupakan senyawa **1** yang telah diisolasi dari spesies ini. Namun senyawa ini memiliki tujuh sinyal gugus metil, sedangkan pada senyawa **1** hanya mempunyai enam gugus metil. Perbedaan nyata juga terlihat pada senyawa ini hanya mempunyai satu sinyal karbonil pada daerah  $\delta_C$  216,9 ppm, sedangkan pada senyawa **1** mempunyai dua sinyal karbonil pada  $\delta_C$  214, 9 dan 169,8 ppm.



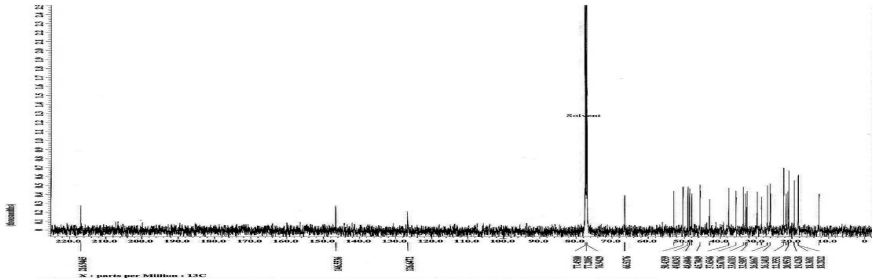
Gambar 4.18. Penggalan spektrum  $^1H$  NMR 3-okso-sikloart-24-en-23-ol (**3**) ada  $\delta_H$  0,50-2,70 ppm

Tabel 10. Data perbandingan geseran kimia karbon dari spektrum  $^{13}\text{C}$  NMR dari 3-okso-sikloart-24-en-23-ol (**3**) 100 MHz untuk  $^{13}\text{C}$  dalam  $\text{DMSO-}d_6$  dengan senyawa **1** dan senyawa pembanding asam 3-okso-23-hidroksisikloart-24-en-26-ol (**1\***)

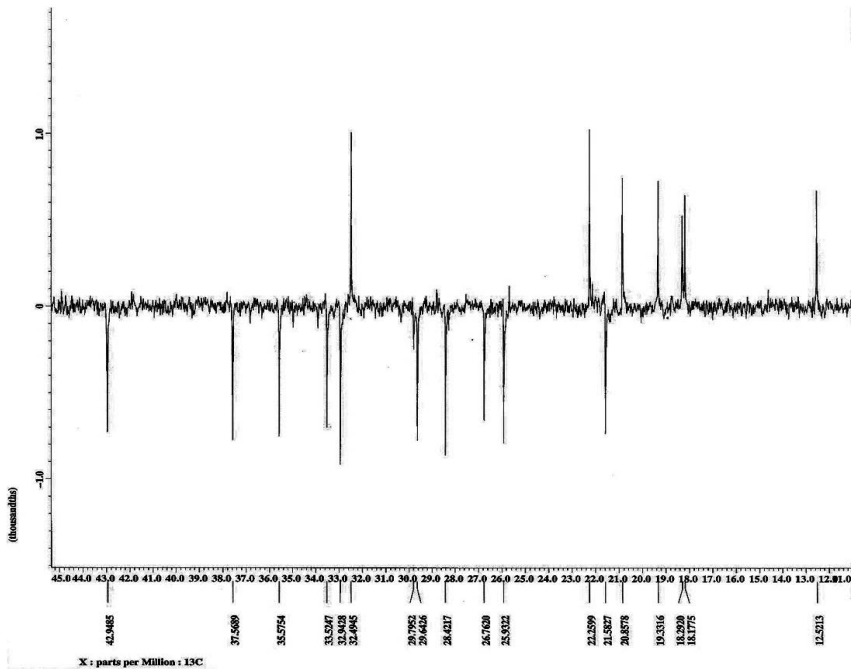
Posisi	$\delta_c$ (ppm) senyawa <b>1</b>	$\delta_c$ (ppm) senyawa <b>3</b>	$\delta_c$ (ppm) ( <b>1*</b> )	DEPT
1	32.5	32,9	33,4	$\text{CH}_2$
2	37.0	37,6	37,4	$\text{CH}_2$
3	214,9	216,9	216,6	C
4	49.4	49,0	50,2	C
5	47.9	48,0	48,4	CH
6	27.0	26,8	21,5	$\text{CH}_2$
7	27.8	29,8	28,2	$\text{CH}_2$
8	47.4	48,6	47,7	CH
9	20.5	21,2	21,0	CH
10	25.5	26,1	26,0	C
11	25.5	28,4	25,6	$\text{CH}_2$
12	32.7	33,6	32,8	$\text{CH}_2$
13	45.0	45,7	45,3	CH
14	48.4	49,2	48,8	C
15	35.2	35,6	35,4	$\text{CH}_2$
16	26	25,9	26,7	$\text{CH}_2$
17	52.3	52,9	52,7	CH
18	18	18,2	18,0	$\text{CH}_3$
19	28.8	29,6	29,5	$\text{CH}_2$
20	31.8	33,0	31,8	CH
21	18.7	18,3	18,3	$\text{CH}_3$
22	42.7	43,0	38,7	$\text{CH}_2$
23	64.4	66,5	69,0	C
24	146.0	146,5	142,1	C
25	125.3	126,6	128,2	C
26	12.4	12,6	12,5	$\text{CH}_3$
27	169,8	32,5	172,5	$\text{CH}_3$

28	20.4	20,9	18,1	CH <sub>3</sub>
29	22.2	22,3	25,8	CH <sub>3</sub>
30	19.1	19,3	20,8	CH <sub>3</sub>

- Anjaneyulu *at al.* (19)

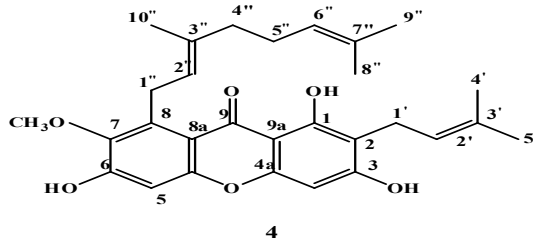


Gambar 4.19. Spektrum <sup>13</sup>C NMR 3-okso-sikloart-24-en-23-ol (3) total

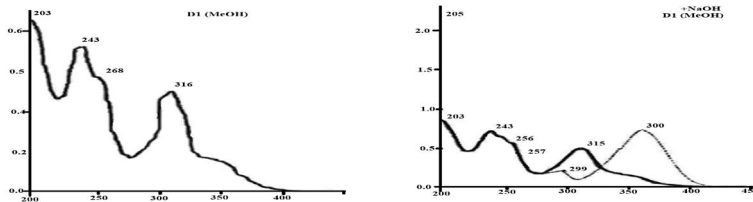


Gambar 4.20. Spektrum DEPT 135 dari 3-okso-sikloart-24-en-23-ol (3)

#### 4.4.4. Penentuan struktur senyawa 4 dari fraksi *n*-heksan kulit batang *G. cowa*

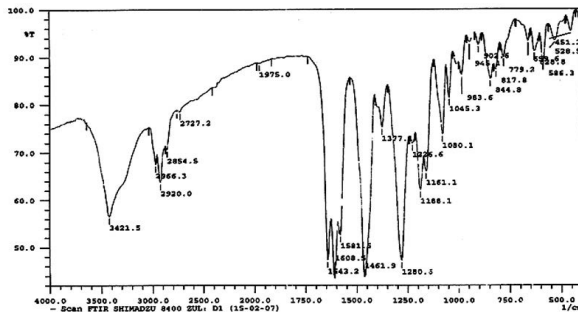


Senyawa **4** berupa kristal berwarna kuning dengan titik leleh 136-137 °C. Spektrum UV (MeOH) menunjukkan serapan maksimum pada  $\lambda_{\text{maks}}$  (log  $\epsilon$ ) nm: 203 (5,62), 243 (5,54), 258 (5,45), dan 315 (5,38) yang karakteristik untuk senyawa golongan santon dan mengalami pergeseran batokromik pada penambahan pereaksi geser NaOH dengan  $\lambda_{\text{maks}}$  (log  $\epsilon$ ) nm: 205 (6,01), 243 (5,50), 267 (5,30), dan 368 (5,54), yang menunjukkan adanya OH fenolik (Gambar 4. 21).



Gambar 4.21. Spektrum UV kowanin (**4**)

Spektrum IR (Gambar 4.22) memperlihatkan adanya pita-pita serapan ( $\nu_{\text{maks}}$   $\text{cm}^{-1}$ ) untuk gugus hidroksil (3421), C-H alifatik (2966, 2920) karbonil terkelasi (1643), konyugasi dari cincin benzena pada (1608, 1581 dan 1461) dan C-O eter ( 1280).



Gambar 4.22. Spektrum IR kowanin (senyawa **4**)

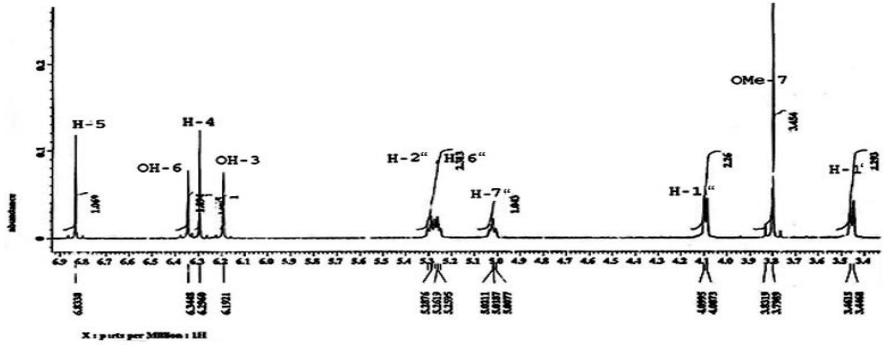
Spektrum  $^1\text{H}$  NMR dan  $^{13}\text{C}$  HNMR dari kowanin (**4**) dalam kloroform- $d_1$  memperlihatkan sinyal-sinyal yang karakteristik untuk senyawa golongan santon yang terprenilasi. Spektrum  $^1\text{H}$  NMR menunjukkan adanya sinyal untuk gugus hidroksil yang terkelasi pada  $d_{\text{H}}$  13,81 (1H, s) yang ditempatkan pada posisi C-1. Tidak adanya sinyal proton aromatik pada daerah 7,40 - 7,60 menunjukkan bahwa tidak adanya proton peri terhadap gugus karbonil. Dua sinyal proton aromatik terlihat pada  $d_{\text{H}}$  6,29 (1H, s) dan 6,83 (1H, s). Pada spektrum  $^1\text{H}$  NMR juga terlihat sinyal-sinyal karakteristik untuk satu unit prenil pada  $d_{\text{H}}$  [3,45 (2H, *d*,  $J = 7,3$ ); 5,02 (1H, *d*,  $J = 7,3$ ); 1,59 (3H, *s*), dan 1,54 (3H, *s*); dan satu unit geraniol pada  $d_{\text{H}}$  [4,09 (2H, *d*,  $J = 6,1$ ); 5,28 (1H, *t*,  $J = 6,1$ ); 1,99 (2H, *m*); 2,04 (2H, *m*); 5,26 (1H, *m*); 1,77 (1H, *s*); 1,85 (3H, *s*); dan 1,82 (3H, *s*) ] seperti terlihat pada Lampiran 9. Sinyal untuk satu proton metoksi pada  $d_{\text{H}}$  3,82 (3H, *s*), hal ini dapat pula terlihat pada Gambar 4.23. Data geseran kimia proton dan karbon dari spektrum  $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$  NMR dari kowanin (**4**) tertera pada Tabel. 11.

Pada spektrum  $^{13}\text{C}$  NMR senyawa **4** dalam kloroform- $d_1$  terlihat adanya 29 sinyal karbon (Gambar 4.24). Pada spektrum DEPT terlihat adanya enam karbon metil pada  $d_{\text{C}}$  62,3 (OMe-7); 16,7 (C-25); 17,9 (24); 18,1 (C-15); 25,9 (C-14); dan 26,1 (C-23). Selanjutnya terlihat pula empat karbon metilen pada  $d_{\text{C}}$  21,6 (C-11); 26,1 (C-23); 26,7 (C-16); dan 39,9 (C-19). Kemudian terlihat pula lima buah karbon metin pada  $d_{\text{C}}$  93,5 (C-4); 101,7 (C-5); 121,6 (C-21); 123,4 (C-17); dan 124,4 (C-12). Akhirnya spektrum DEPT menunjukkan adanya 14 buah karbon kuartener pada  $d_{\text{C}}$  160,8 (C-1); 108,6 (C-2); 161,8 (C-3); 155,0 (C-4a); 154,6 (C-60); 142,7 (C-7); 136,0 (C-8); 112,4 (C-8a); 182,0 (C-9) karbonil dengan posisi para terhadap gugus hidroksi, dimana sinyal ini khas untuk inti santon);, 103,8 (C-9a); 156,0 (C-10a); 132,0 (C-13); 137,3 (C-18); dan 136,02 (C-22) yang terlihat pada Lampiran 10 dan 11.

Tabel.11. Data geseran kimia proton dan karbon dari spektrum  $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$  - NMR dan korelasi NMR 2-D dari kowanin (**4**) 500 MHz untuk  $^1\text{H}$  dan 125 MHz untuk  $^{13}\text{C}$  dalam kloroform- $d_1$

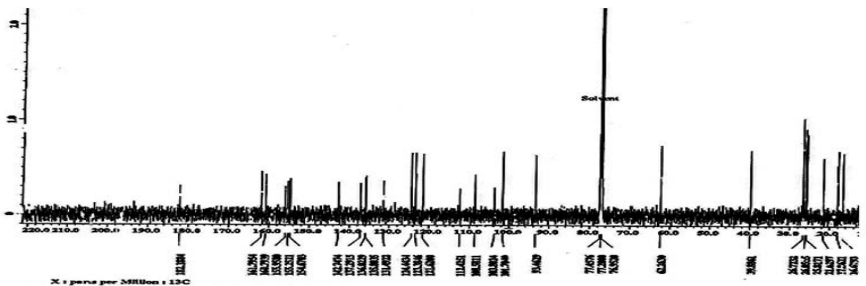
Posisi	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), integrasi, multiplisitas, $J(\text{Hz})$	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	DEPT	HMBC
1		160,8	C	
1-OH	13,81(1H, s)			C-9a, C-2, C-1
2		108,6	C	

3		161,8	C	
3-OH	6,19 (1H, <i>s</i> )			C-2, C-3, C-4
4	6,29 (1H, <i>s</i> )	93,5	CH	C-2, C-3, C-4a, C-9a
4a		155,0	C	
5	6,83 (1H, <i>s</i> )	101,7		C-7, C-8a, C-10 <sup>a</sup>
6		154,6	CH	
6-OH	6,34 (2H, <i>s</i> , 7,3)			C-5, C-6
7		142,7	C	
7-OMe	3,82 (3H, <i>s</i> )	62,3		C-7
8		136,0	C	
8a		112,4	C	
9		182,0	C	
9a		103,8	C	
10a		156,0	C	
1'	3,45 (2H, <i>d</i> , 7,3)	21,6	CH <sub>2</sub>	C-2, C-3
2'	5,02 (1H, <i>t</i> , 7,3)	124,4	CH	
3'		132,0	C	
4'	1,59 (3H, <i>s</i> , 3,7)	25,8	CH <sub>3</sub>	C-12, C-13, C-15)
5'	1,54 (3H, <i>s</i> )	18,1	CH <sub>3</sub>	C-12, C-13, C-14
1''	4,09(2H, <i>d</i> , 6,1)	26,7	CH <sub>2</sub>	C-8a, C-17, C-18, C-7
2''	5,28 (1H, <i>t</i> , 6,1)	123,4	CH	
3''		137,3	C	
4''	1,99 (2H, <i>m</i> )	39,9	CH <sub>2</sub>	C-20
5''	2,04 (2H, <i>m</i> )	25,8	CH <sub>2</sub>	C-19
6''	5,26(1H, <i>d</i> )	121,6	CH	C-20, C-22, C-24)
7''		136,0	C	
8''	1,77 (3H, <i>s</i> )	26,1	C	C-21, C-22, C-24
9''	1,85 (3H, <i>s</i> )	17,9	CH <sub>3</sub>	C-21, C-22, C-23
10''	1,82 (3H, <i>s</i> )	16,7	CH <sub>3</sub>	C-17, C-18, C-19)



Gambar 4.23. Spektrum  $^1\text{H}$  NMR sebagian kowanin (**4**) untuk daerah  $d_{\text{H}}$  3,40 - 6,90 ppm

Berdasarkan analisis data  $^{13}\text{C}$  NMR D-1 dimensi diketahui senyawa hasil isolasi mempunyai rumus molekul  $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{O}_6$  dengan berat molekul = 478, dan nilai DBE = 13. Hal ini terdiri dari sembilan ikatan rangkap  $\text{C}=\text{C}$  (enam diantaranya untuk rangka dasar santon, satu untuk unit prenil dan dua untuk unit geranil), satu karbonil ( $\text{C}=\text{O}$ ) dan tiga cincin dari rangka dasar santon.

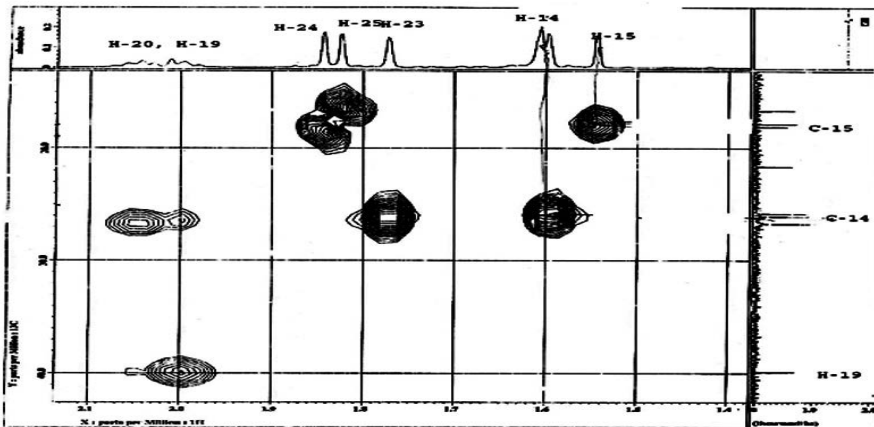


Gambar 4.24. Spektrum  $^{13}\text{C}$  NMR kowanin (**4**) total

Identifikasi sinyal-sinyal karbon lebih lanjut ditetapkan berdasarkan spektrum NMR 2-D, HMQC, HMBC. Pada spektrum HMBC (Lampiran 13) terlihat proton pada  $d_{\text{H}}$  1,59 berkorelasi dengan karbon pada  $d_{\text{C}}$  124,4 (C-2') dan  $d_{\text{C}}$  132,0 (C-3'), proton pada  $d_{\text{H}}$  1,77 berkorelasi dengan karbon  $d_{\text{C}}$  121,6 (C-6'') dan  $d_{\text{C}}$  130,0 ppm (C-7''). Selanjutnya proton pada  $d_{\text{H}}$  1,82 berkorelasi dengan karbon pada  $d_{\text{C}}$  123,4 (C-2'') dan  $d_{\text{C}}$  136,0 ppm (C-7''). Untuk proton pada  $d_{\text{H}}$  11,85 pada spektrum HMBC berkorelasi dengan karbon pada  $d_{\text{C}}$  121,6 (C-6'') dan  $d_{\text{C}}$  136,0 ppm (C-7''). Proton aromatik pada  $\delta_{\text{H}}$  6,29 berikatan



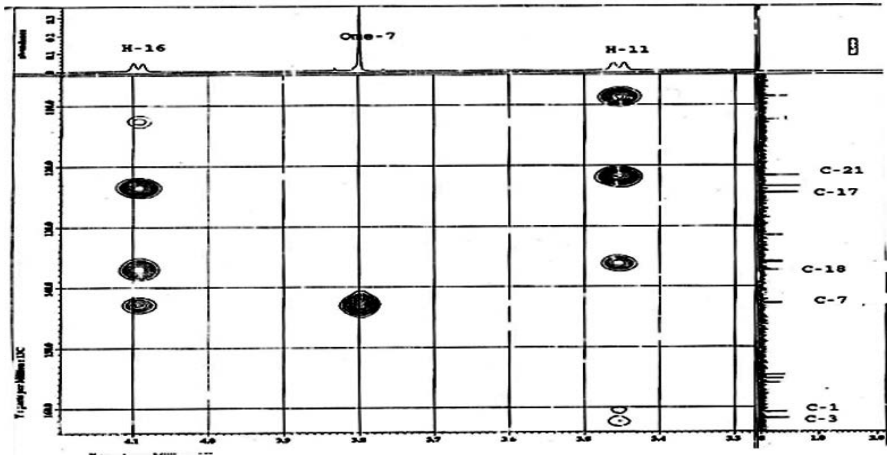
langsung dengan  $\delta_c$  93,5 (C-4) dan pada HMBC terlihat bahwa proton ini berkorelasi lewat tiga ikatan dengan karbon pada  $d_c$  108,6 (C-2), dan 103,8 (C-9a) dan lewat dua ikatan dengan karbon pada  $d_c$  155,3 (C-4a) dan 161,8 (C-3) sehingga proton ini ditempatkan pada posisi C-4. Proton pada  $\delta_H$  6,83 pada spektrum HMQC berikatan langsung dengan karbon pada  $\delta_c$  154,6 (Lampiran 12) dan pada spektrum HMBC terlihat bahwa proton ini berkorelasi dengan karbon pada  $\delta_c$  112,4 (C-8a), dan 142,7 (C-7) dan lewat dua ikatan dengan karbon pada 156,0 (C-10a), sehingga proton ini ditempatkan pada posisi C-5.



Gambar 4.25. Spektrum HMQC kowanin (4)

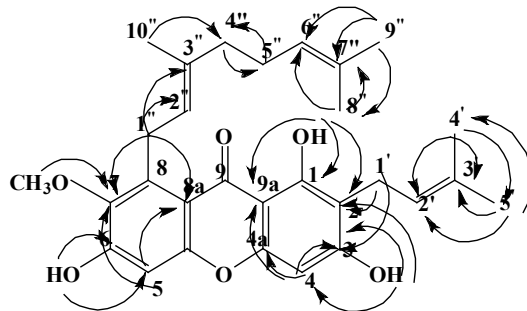
Pada spektrum HMBC (Gambar 4.25) terlihat proton pada  $\delta_H$  3,45 (H-11) berkorelasi lewat dua ikatan dengan karbon pada  $\delta_c$  108,6 (C-2) dan lewat tiga ikatan dengan karbon pada 161,8 (C-3), sehingga unit prenil ini ditempatkan pada posisi C-2. Proton benziklik pada 4,09 (2H,  $d, J = 6,1$ ) dari gugus geranil pada spektrum HMBC menunjukkan korelasi dengan karbon pada 112,4 (C-8<sup>a</sup>), 123,4 (C-17), 137,3 (C-18), 142,7 (C-7), sehingga gugus geranil ini ditempatkan pada posisi C-8 pada cincin B. Dari spektrum HMQC juga terlihat bahwa proton metil dari gugus metoksi pada  $d_H$  3,82 terikat pada karbon  $\delta_c$  62,26 dan dalam spektrum HMBC terlihat proton ini berkorelasi lewat tiga ikatan dengan karbon pada  $\delta_c$  142,7 (C-7), sehingga proton metoksil ini ditempatkan pada posisi C-7. Pada spektrum HMBC juga terlihat proton hidroksil pada  $d_H$  6,34 (2H,  $d, J = 7,3$ ) berkorelasi lewat tiga ikatan dengan karbon pada  $d_c$  101,7 (C-5) dan lewat dua ikatan dengan karbon pada  $d_c$  154,6 (C-6) sehingga proton ini ditempatkan pada posisi C-6. Selanjutnya OH pada  $d_H$  13,81 pada spektrum HMBC

menunjukkan korelasi dengan karbon pada  $d_c$  103,8 (C-9a), 108,6 (C-2) dan 160,8 (C-1). Sinyal untuk proton pada  $d_H$  6,19 (1H, s) pada spektrum HMBC berkorelasi lewat dua ikatan dengan karbon pada 161,8 (C-3) dan lewat tiga ikatan dengan karbon pada 108,6 (C-2) dan 93,5 (C-4), sehingga proton ini ditempatkan pada posisi C-3, hal ini terlihat pada Gambar 4.26.



Gambar 4.26. HMBC kowanin (4)

Hubungan antara proton dengan karbon tetangganya yang berjarak dua dan tiga ikatan pada spektrum HMBC untuk senyawa 4 dapat dilihat pada Gambar 4.27.

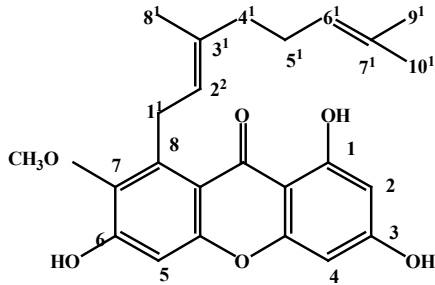


Gambar 4.27. HMBC senyawa 4

Dari analisis yang telah dilakukan terhadap spektrum <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, HMQC, HMBC, dan sifat fisik titik leleh terhadap kowanin pembanding 135-137 °C (Na Pattalung *et al.*, 1994) dan senyawa hasil isolasi 136-137 °C dapat disimpulkan bahwa senyawa 4 adalah jenis

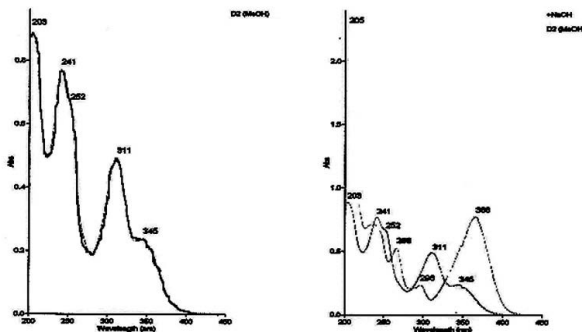
santon terprenilasi yaitu 1,3,6-trihidroksi-7-metoksi-2-(3-metilbut-2-enil)-8-(3,7-dimetil-2,6-oktadienilsanton (kowanin), dengan rumus molekul  $C_{29}H_{34}O_6$ , BM = 478. Data MS senyawa **4** dapat dilihat pada Lampiran 14

#### 4.4.5. Penentuan struktur senyawa **5** dari fraksi diklorometan kulit batang *G. cowa*



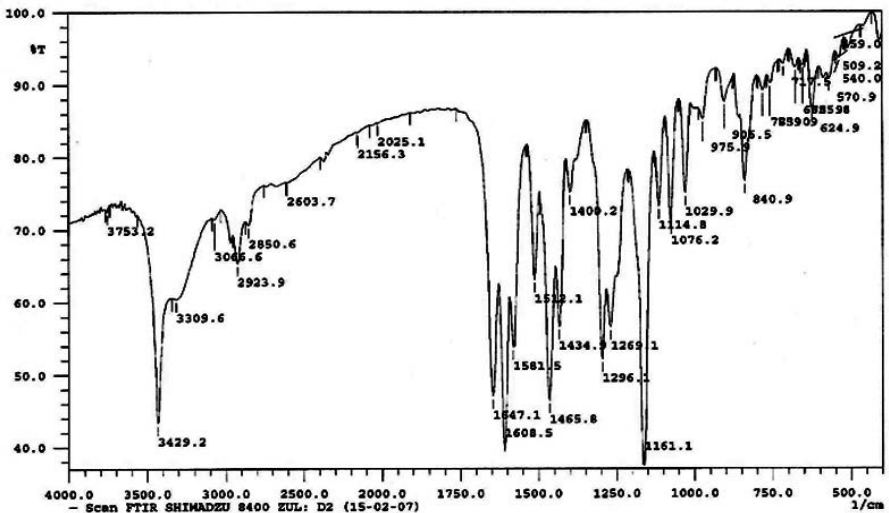
5

Senyawa **5** diperoleh berupa kristal berwarna kuning dengan titik leleh 205 – 206 °C. Spektrum UV (Gambar 4.29) dan IR (Gambar 4.30) senyawa **5** memperlihatkan serapan yang mirip dengan spektrum UV dan IR senyawa **4**. Spektrum UV menunjukkan serapan maksimum pada  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) nm: 203 (5,56), 241 (5,50), 252 (5,44), 311 (5,37), dan 345 (5,00) yang merupakan gugus kromofor yang mengalami perpanjangan konyugasi dan pergeseran batokromik dengan penambahan pereaksi natrium hidroksida dengan  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) nm: 205 (5,96), 236 (5,47), 266 (5,34), 296 (4,98), dan 366 (5,50).



Gambar 4.28, 4.29. Spektrum UV rubrasanton (**5**) dan penambahan NaOH

Pemeriksaan spektrum IR (KBr) menunjukkan adanya serapan kuat pada daerah bilangan gelombang  $3429\text{ cm}^{-1}$  hal ini membuktikan adanya gugus  $\text{-OH}$  bebas dan juga terjadinya *broad* spektrum diduga karena adanya gugus  $\text{OH}$  lainnya yang mempunyai ikatan hidrogen. Spektrum dengan panjang gelombang  $2924\text{ cm}^{-1}$  ini merupakan rentangan vibrasi  $\text{CH}_3$  simetris sedangkan pada  $2850\text{ cm}^{-1}$   $\text{CH}_3$  asimetri. Serapan pada daerah  $1647\text{ cm}^{-1}$  merupakan serapan  $\text{C=O}$  yang terkonyugasi dengan ikatan rangkap yang diperkuat dengan adanya sinyal pada spektrum  $^{13}\text{C-NMR}$  pada geseran kimia  $\delta_c$  183,2 ppm. Rentangan  $\text{C-H}$  aromatik dapat dilihat pada bilangan gelombang  $3066\text{ cm}^{-1}$  diperkuat dengan adanya serapan pada 1608, 1581, 1465  $\text{cm}^{-1}$  ( serapan untuk  $\text{C=C}$  terkonyugasi dari cincin benzena) dan  $1161\text{ cm}^{-1}$  untuk regangan  $\text{C-O-C}$  (Gambar.30).



Gambar 4.30. Spektrum IR rubrasanton (5)

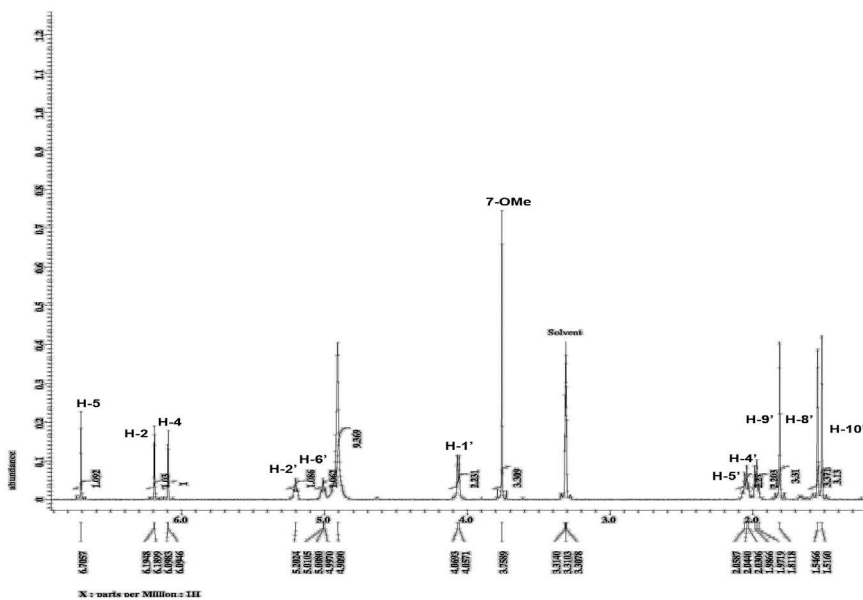
Pada spektrum  $^1\text{H NMR}$  terlihat adanya sinyal- sinyal yang khas untuk proton hidroksil yang terkelasi pada  $\delta_H$  13,0 (1H, s), sinyal untuk proton metoksil pada  $\delta_H$  3,76 ppm (3H, s), dua sinyal dari proton aromatik yang berada pada posisi meta masing-masing muncul sebagai puncak *doblet* dengan  $J = 1,85$  pada  $\delta_H$  6,10 dan 6,20 dan satu sinyal proton aromatik lainnya pada 6,71 (1H, s) yang tidak terkopling. Selanjutnya juga terlihat adanya satu unit geranil dengan sinyal-sinyal proton pada  $\delta_H$  [4,06 (2H, d,  $J = 7,4$ ); 5,20 (1H, t,  $J = 7,4$ ); 1,97 (2H, m,  $J = 6,7$ )];  $\delta_H$  2,04 [(2H, m,  $J = 6,7$ ); 5,01 (1H, t,  $J = 6,7$ ); 1,81 (3H, s)]; dan  $\delta_H$  1,51 (3H, s), dapat dilihat pada Gambar 4.31.

Pada spektrum  $^{13}\text{C}$  NMR terlihat adanya 24 sinyal karbon diantaranya 169 sinyal pada  $\delta_{\text{C}}$  183 ppm yang merupakan sinyal dari gugus karbonil dari inti santon. Sinyal pada  $\delta_{\text{C}}$  61,5 ppm merupakan sinyal khas untuk karbon dari gugus metoksil, dapat dilihat pada Gambar 4.32. Data geseran kimia proton dan karbon dari spektrum  $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$  NMR rubrasanton (**5**) tertera pada Tabel 4.5.

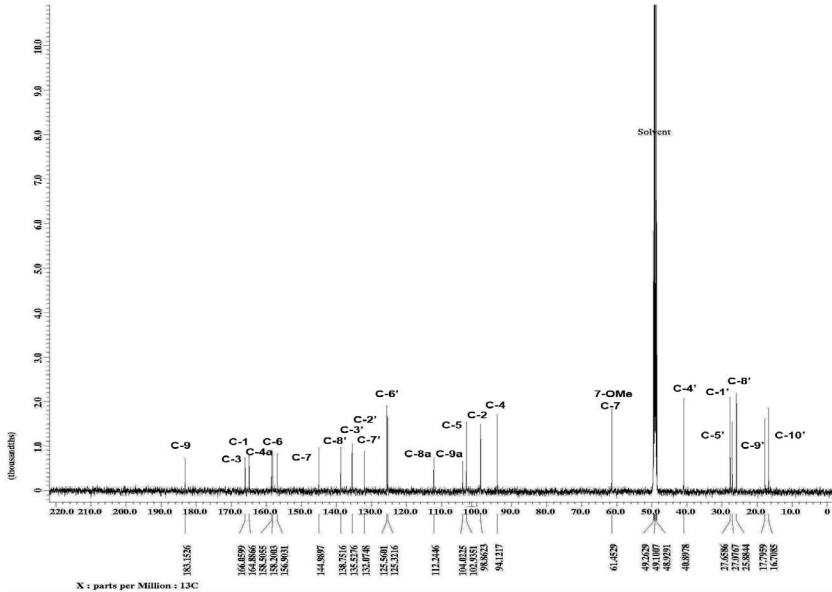
Tabel 12. Data geseran kimia proton dan karbon dari spektrum  $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$  NMR dan korelasi NMR 2D dari rubrasanton (**5**) 500 MHz untuk  $^1\text{H}$  dan 125 MHz untuk  $^{13}\text{C}$  dalam Metanol- $d_4$  dan rubrasanton (**5\***) sebagai pembanding

Posisi C	$\delta_{\text{H}}$ (integrasi, multiplisitas, J (Hz))	$\delta_{\text{H}^*}$ (ppm) $\text{S}^*$	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}^*}$ (ppm) $\text{S}^*$	HMBC H→C
1			164,9	160,9	
1-OH	13,0	13,83			
2	6,10 (1H, <i>d</i> , 1,85,)		98,9	108,0	C-4, C-1
3			166,1	161,6	
3-OH					
4	6,20 (1H, <i>d</i> , 1,85)	6,35 (1H, <i>s</i> )	94,1	93,6	C-2, C-9a, C-4a
4 <sup>a</sup>			158,5	155,3	
5	6,71 (1H, <i>s</i> )	6,84 (1H, <i>s</i> )	102,9	101,6	C-8 <sup>a</sup> , C-7, C-6
6			156,1	154,6	
6-OH					C-7
7			145,0	142,6	
7-OMe	3,76 (3H, <i>s</i> )	3,81 (3H, <i>s</i> )	61,5	62,0	
8			138,8	137,1	
8 <sup>a</sup>			112,2	112,3	
9			183,2	182,0	
9 <sup>a</sup>			104,1	103,5	
10 <sup>a</sup>			158,2	155,9	
1 <sup>1</sup>	4,06 (2H, <i>d</i> , 7,4)	4,11 (2H, <i>d</i> , 7)	27,1	26,6	
2 <sup>1</sup>	5,20 (1H, <i>t</i> , 7,4)	5,27 (1H, <i>t</i> , 7)	125,6	123,3	C-8', C-4'

3 <sup>1</sup>			135,5	135,6	
4 <sup>1</sup>	1,97(2H, <i>m</i> , 6,7)	1,96 (2H, <i>m</i> , 6,7)	40,9	39,7	C-6', C-3'
5 <sup>1</sup>	2,04 (2H, <i>m</i> , 6,7)	2,05(2H, <i>m</i> , 6,7)	27,7	26,5	C-6', C-7', C-3'
6 <sup>1</sup>	5,01 (1H, <i>t</i> , 6,7)	5,03(1H, <i>br</i> , <i>t</i> , 7)	125,3	124,3	C-8', C-9'
7 <sup>1</sup>			132,7	130,5	
8 <sup>1</sup>	1,55 (3H, <i>s</i> )	1,60(3H, <i>s</i> )	17,8	25,6	C-6', C-7'
9 <sup>1</sup>	1,81 (3H, <i>s</i> )	1,83(3H, <i>s</i> )	16,7	16,5	C-6'
10 <sup>1</sup>	1,51 (3H, <i>s</i> )	1,55(3H, <i>s</i> )	16,7	17,7	C-7'



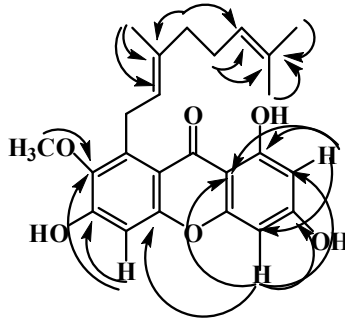
Gambar 4.31. Spektrum <sup>1</sup>H NMR sebagian rubrasanton (**5**) untuk daerah d<sub>H</sub> 1,52 - 6,71 ppm



Gambar 4.32. Spektrum  $^{13}\text{C}$  NMR sebagian rubrasanton ( **5** ) untuk  $d_{\text{H}}$  16,7-183,1 ppm

Pada spektrum HMBC (Lampiran 16) terlihat proton pada  $\delta_{\text{H}}$  6,10 (1H, *d*,  $J = 1,85$ ) berkorelasi lewat dua ikatan dengan karbon pada  $\delta_{\text{C}}$  164,9 (C-1) dan lewat tiga ikatan dengan karbon pada 94,1 (C4) dan 104,1 (C-9a), sehingga proton ini ditempatkan pada posisi C-2 (Lampiran 15). Proton pada 6,20 (1H, *s*,  $J = 1,85$ ) yang terkopling *meta* dengan proton pada  $\delta_{\text{H}}$  6,10 pada HMBC terlihat berkorelasi dengan karbon pada  $\delta_{\text{C}}$  166,1 (C-3) lewat dua ikatan dan dengan karbon pada  $\delta_{\text{C}}$  98,9 (C-2) dan  $\delta_{\text{C}}$  104,1 (C-9a) dan lewat tiga ikatan sehingga proton ini ditempatkan pada posisi C-4. Selanjutnya proton pada  $\delta_{\text{H}}$  6,71 (1H, *s*) pada spektrum HMQC terikat dengan karbon pada  $\delta_{\text{C}}$  102,9 ppm. Pada spektrum HMBC terlihat berkorelasi lewat dua ikatan dengan karbon pada  $\delta_{\text{C}}$  156,1 (C-6) dan lewat tiga ikatan dengan karbon pada  $\delta_{\text{C}}$  145,0 (C-7), sehingga proton ini ditempatkan pada posisi C-5. Proton metoksil pada  $\delta_{\text{H}}$  3,76 (3H, *s*) pada HMBC terlihat berkorelasi dengan karbon pada  $\delta_{\text{C}}$  145,0 (C-7) (Lampiran 16) dan gugus metoksil ini ditempatkan pada posisi C-7. Selanjutnya unit geranil ditempatkan pada posisi C-8. Data spektrum NMR dari senyawa **5** menunjukkan adanya kemiripan dengan data NMR dari rubrasanton seperti terlihat pada Tabel 12.

Hubungan antara proton dengan karbon tetangganya yang berjarak dua ikatan dan tiga ikatan dari spektrum HMBC untuk senyawa **5** dapat dilihat pada Gambar 4.33.



Gambar 4.33. Korelasi HMBC rubrasanton (**5**)

Dari analisis yang telah dilakukan terhadap spektrum  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, HMQC, dan HMBC serta dengan membandingkan data yang telah dilaporkan dalam pustaka maka disimpulkan bahwa senyawa **5** adalah jenis santon yang terprenilasi dalam bentuk geranil yaitu 1,3,6-trihidroksi-7-dimetoksi-8-(3,7-dimetil-2,6-oktadienil)-santon atau dikenal dengan rubrasanton rumus molekul  $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_6$  dan BM = 410.

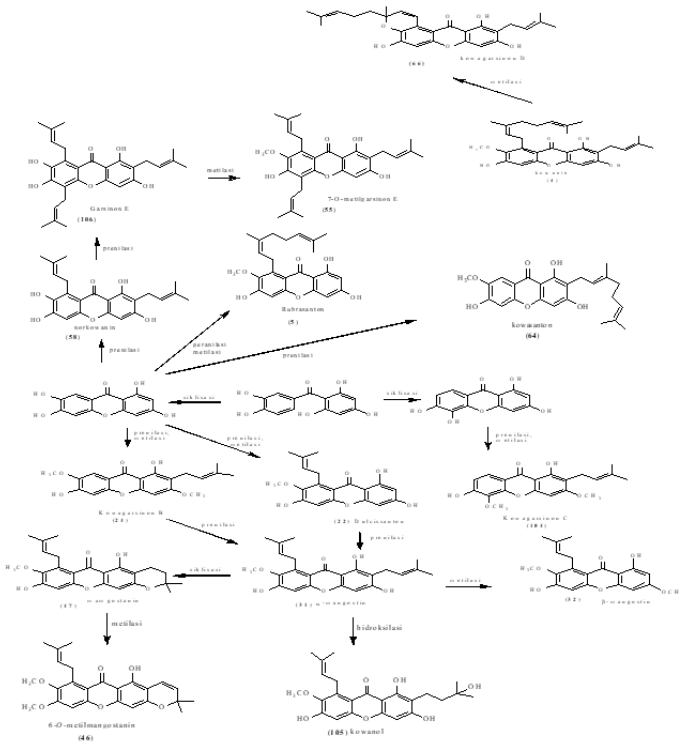
#### 4.5. Kajian Biogenesis Senyawa Hasi I Isolasi

Dua senyawa golongan santon yaitu kowanin (**4**) dan rubrasanton (**5**) telah berhasil diisolasi dari *G. cowa*. Kedua senyawa ini merupakan senyawa yang telah dikenal (Na Pattalung *et al.*, 1994; Wahyuni, *at al.*, 2004a; dan Mahabusarakam *at al.*, 2005)). Berdasarkan penelusuran pustaka dari kulit batang *G. cowa* juga telah dilaporkan tiga senyawa santon lainnya yaitu 7-*O*-metilgarsinon E, garsinon E (Likhitwitayawuid *et al.*, 1997), 1,4-(1,1-dimetilprop-2-enil)-1,5,6-trihidroksi-3-metoksi-2-(3-metilbut-2-enil) santon, dan satu senyawa turunan kuinon yaitu tetraprenil tolokuinon (Wahyuni *et al.*, 2004a). Selanjutnya dari buah *G. cowa* telah ditemukan beberapa senyawa golongan santon terprenilasi yaitu *b*-mangostin (**32**), kowanol (**105**), mangostanin (**47**), 6-*O*-metil mangostanin (**46**),  $\alpha$ -mangostin (**31**) dan kowagarsinon B-E (**24**, **104**, **65**, dan **66**) (Panthong *et al.*, 2006). Mahabusarakam *et al.* (2005) melaporkan dari getah *G. cowa* terdapat kowanol (**4**) dan 1,3,6-trihidroksi-7-metoksi-2,5-di-(3-metilbut-2-enil) santon, serta kowanin (**4**) dan rubrasanton (**5**) yang juga ditemukan



pada bagian kulit batang. Dari penelusuran pustaka terlihat bahwa *G. cowa* cenderung menghasilkan santon dalam bentuk terprenilsi dan belum ditemukan santon dalam bentuk teroksigenasi maupun benzofenon.

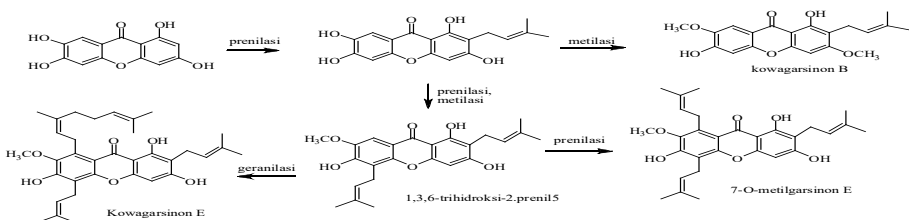
Beberapa usulan biogenesis senyawa golongan santon telah dilaporkan menggunakan 2,3',4,6- tetrahidroksibenzofenon atau maklurin (72) sebagai prekursornya seperti halnya yang telah dikemukakan Carpenter *et al.* dimana  $\alpha$ -mangostin merupakan suatu jenis santon terprenilasi (Bennett and Lee, 1976). Sebagaimana halnya  $\alpha$ -mangostin (31), maka biogenesis dari senyawa hasil isolasi juga diusulkan menggunakan prekursor maklurin (72) yang mengalami siklisasi membentuk 1,3,6,7-tetrahidroksisanton dan 1,3,5,6 tetrahidroksisanton serta mengalami reaksi sekunder lainnya. Kaitan usulan biogenesis senyawa hasil isolasi dari *G. cowa* dan dihubungkan dengan beberapa senyawa santon yang telah ditemukan sebelumnya ditunjukkan pada Gambar 4.3



Gambar 4.34. Usulan biogenesis senyawa hasil isolasi *G. cowa*

Pembentukan  $\alpha$ -mangostin (**31**) melalui bentuk antara dulcissanton (**22**) yang terbentuk dari 1,3,6,7-tetrahidroksisanton dan mengalami prenilasi pada posisi 8, metilasi pada posisi 7, serta metilasi pada posisi 2 seperti halnya yang telah diusulkan oleh Carpenter (Bennett and Lee, 1990) atau melalui kowagarsinon B (**24**). Selanjutnya metilasi dari OH pada posisi 3 dari  $\alpha$ -mangostin (**32**) membentuk *b*-mangostin (**33**), sedangkan bila terjadi siklisasi dari prenil pada posisi 2 dengan adanya gugus hidroksil pada posisi 3 akan membentuk mangostanin (**47**). Hidrasi dari unit prenil pada posisi 2 dari  $\alpha$ -mangostin (**31**) akan membentuk kowanol (**105**). Metilasi dari gugus hidroksil mangostanin (**47**) pada posisi 6 dapat menjelaskan hubungan biogenesis antara mangostanin (**47**) dan 6-*O*-metilmangostanin (**46**). Jika terjadi geranilasi pada posisi 8, metilasi pada posisi 7 dari 1,3,6,7 tetrahidroksisanton dan diikuti dengan prenilasi pada posisi 2 akan dapat menjelaskan hubungan biogenesis antara rubrasanton (**5**) dan kowanin (**4**). Dari *G. fusca* telah ditemukan 1,3,7-trihidroksi-8-(3,7-dimetilokta-2,6-dienil)santon atau fuskasanton F (**40**) yang dilaporkan oleh Ito *et al.* (2003). Hal ini membuktikan bahwa pembentukan rubrasanton (**5**), 1,3,6,7-tetrahidroksi santon terjadi melalui proses geranilasi terlebih dahulu dan diikuti dengan proses metilasi. Bila geranilasi terjadi pada posisi 2 maka akan terbentuk kowasanton (**64**). Untuk biogenesis dari *nor*-kowanin (**38**) juga diusulkan dari 1,3,6,7-tetrahidroksisanton melalui 1,3,6,7-tetrahidroksi-2-(3-metilbut-2-enil)santon yang diikuti dengan prenilasi pada posisi 8. Jika terjadi prenilasi pada posisi 5 dan diikuti metilasi pada posisi 7 dari *nor*-kowanin (**38**) dapat diusulkan untuk pembentukan garsinon E (**50**) dan 7-*O*-metilgarsinon E (**55**).

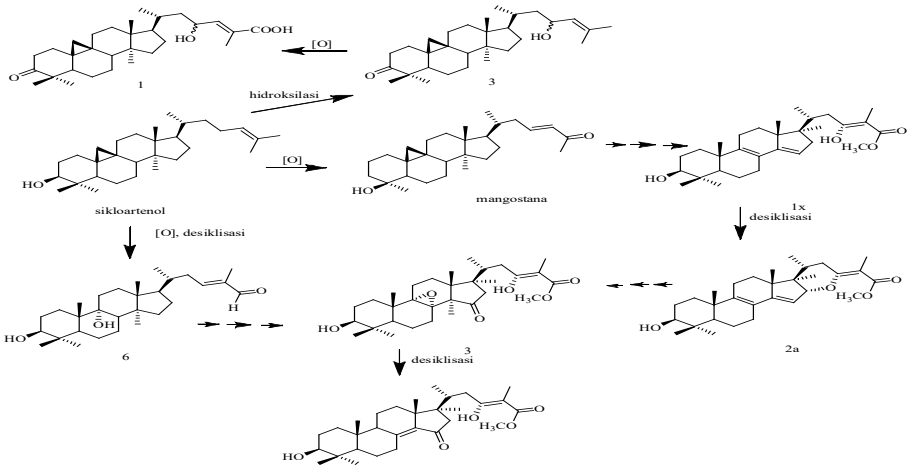
Selanjutnya untuk biogenesis dari 1,3,6-trihidroksi 7-metoksi-2,5-di-(3-metilbut-2-enil)santon; kowagarsinon A (**24**); dan kowagarsinon E (**25**) ditunjukkan pada Gambar 4.34.



Gambar 4.35. Usulan kaitan biogenesis dari kowagarsinon A, E, dan 1,3,6 trihidroksi 7-metoksi-2,5-di-(3-metilbut-2-enil)santon

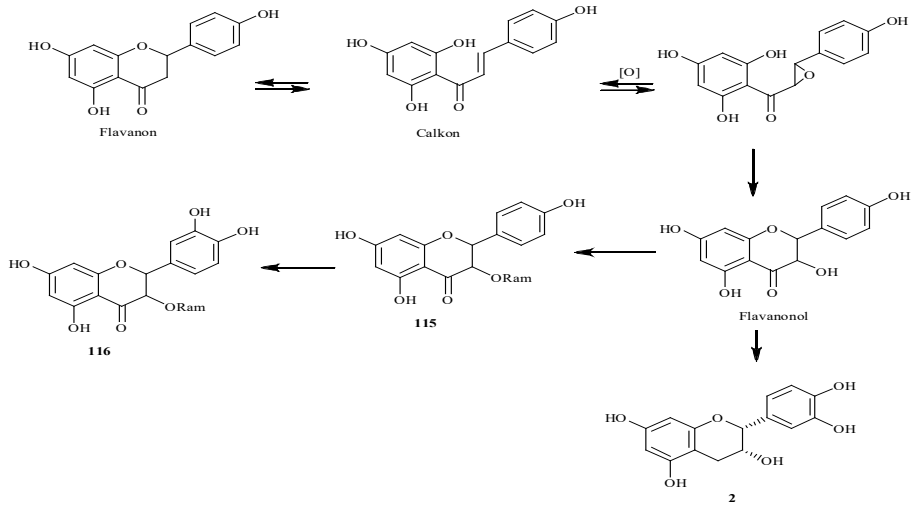
Dari *G. cornea* berhasil diolasi dua seyawa golongan triterpenoid yaitu asam 3-okso-23-hidroksisikloart-24-en-26-oat (**1**) dan 3-okso-sikloart-24-en-23-ol (**3**) dan satu senyawa golonga flavonoid dengan inti flavan yaitu (-)-epikatekin (**2**). Ketiga senyawa ini untuk pertama kalinya dilaporkan dari *G. cornea*, namun senyawa **1** telah pernah ditemukan sebelumnya dari famili *Anacardiaceae* yaitu *Mangivera indica* (Anjaneyulu, 1976), sedangkan senyawa **2** telah ditemukan sebelumnya dari *Garcinia* spesies lain yaitu *G. dulcis* (Deachatai, 2005). Senyawa **3** berdasarkan penelusuran *scifinder* merupakan senyawa baru.

Triterpenoid merupakan kelompok senyawa minor dari genus *Garcinia*. Beberapa senyawa triterpenoid yang telah dilaporkan dari spesies genus *Garcinia* antara lain 3 $\beta$ -hidroksi-26-nor-9,19-sikloart-23-en-25-on dari daun *G. mangostana* (Parveen *et al.*, 1991), friedolanostan 1, 2a, 3, 4, lanostan 6 dari kulit batang *G. speciosa* (Vieira *et al.*, 2004). Dari senyawa yang telah ditemukan terlihat bahwa triterpenoid dari genus *Garcinia* memiliki gugus karboksilat pada rantai samping. Usulan biogenesis dua senyawa triterpen hasil isolasi dan kaitannya dengan senyawa triterpenoid dari genus lain seperti tertera pada Gambar 4.35.



Gambar 4.36. Usulan biogenesis 3-okso-sikloart-24-en-23-ol (**3**) dan asam 3-okso-23-hidroksisikloart-24-en-26-oat (**1**)

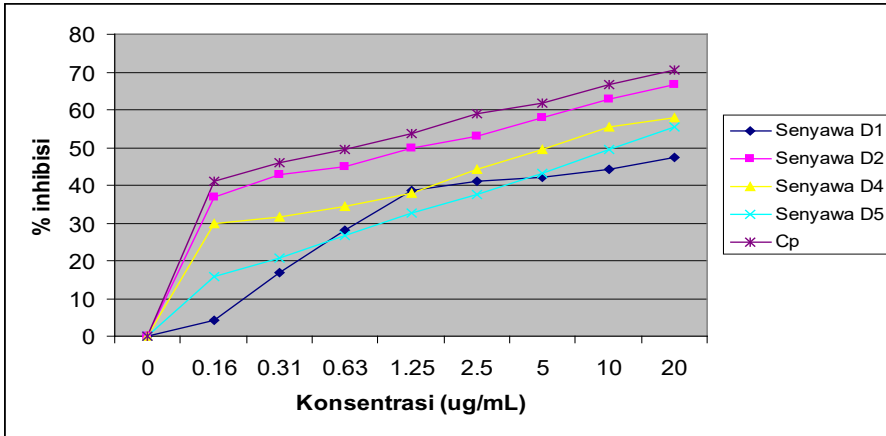
Usulan biogenesis (-)-epikatekin dan kaitannya dengan senyawa golongan flavonoid lain telah dikemukakan oleh Grisebach dan Haslam (Achmad, 1986).



Gambar 4.37. Usulan biogenesis (-)-epikatekin (**2**)

#### 4.6. Aktivitas Sitotoksik Senyawa Hasil Isolasi

Pengujian aktivitas sitotoksik terhadap senyawa hasil isolasi dilakukan dengan metode sulforhodamin B (SRB) menggunakan sel kanker payudara manusia T47D. Pengukuran aktivitas sitotoksik berdasarkan % viabilitas yaitu banyak sel yang dapat bertahan melalui pengukuran absorbansi warna SRB yang mengikat sel pada  $\lambda_{maks}$  512 nm dengan variasi konsentrasi senyawa uji dan standar (20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3123, dan 0,1562  $\mu\text{g/mL}$ ) tertera pada Gambar 4.37. Penambahan senyawa uji yang bersifat sitotoksik akan menyebabkan pengurangan warna SRB yang mengikat sel, sehingga absorbansi akan berkurang. Dari nilai absorbansi yang diperoleh dapat dihitung nilai % viabilitas, dan dari nilai viabilitas dapat dihitung % inhibisi atau % toksisitas. Pengaruh konsentrasi senyawa uji dan standar terhadap nilai % inhibisi sel ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4.38. Pengaruh konsentrasi senyawa uji dan standar (20, 10, 5, 2,5, 1,25 dan 0,625, 0,3123, dan 0,1562  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) terhadap nilai % inhibisi sel

Pada Gambar 4.37 terlihat semua senyawa uji memberikan nilai % inhibisi. Peningkatan konsentrasi senyawa uji akan menyebabkan semakin meningkatnya nilai % inhibisi artinya semakin banyak jumlah sel yang mati, sehingga senyawa uji semakin bersifat sitotoksik. Pada Gambar 4. juga terlihat semua senyawa uji memberikan aktivitas di bawah senyawa standar (cis-platin) yang digunakan.

Aktivitas tertinggi ditunjukkan oleh (-)-epikatekin (senyawa **2**) yang memberikan nilai % inhibisi mendekati standar (Cp). Selanjutnya kowanin (senyawa **4**), rubrasanaton (**5**) dan asam 3-okso - 23-hidroksisikloart-24-en-26-oat (**1**). Efektivitas dari senyawa uji dihitung melalui penentuan nilai  $\text{IC}_{50}$  yaitu konsentrasi senyawa uji yang dapat mematikan 50% sel uji. Nilai  $\text{IC}_{50}$  masing-masing senyawa uji dan standar tertera pada Tabel 13.

Tabel 13 . Data nilai  $\text{IC}_{50}$  senyawa hasil isolasi dari *G. cornea* dan *G. cowa*

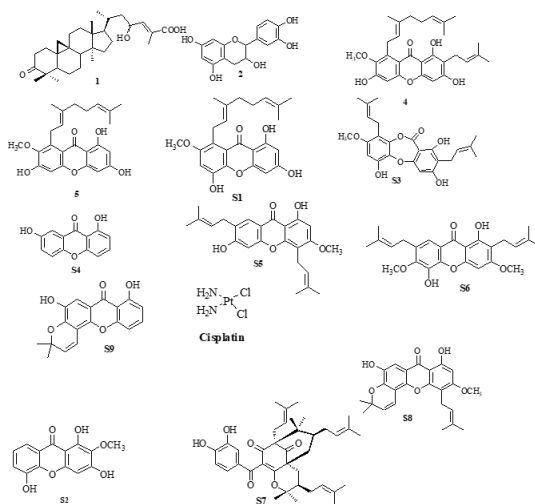
No	Senyawa Uji	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
1	Asam 3 -okso-23-hidroksisikloart-24-en-26-oat ( <b>1</b> )	17,3
2	(-)- (epikatekin) ( <b>2</b> )	3,6
3	Kowanin ( <b>4</b> )	10,4
4	Rubrasanton ( <b>5</b> )	13,5
5	Cis Pt	0,3

Dari Tabel 4.6 terlihat bahwa semua senyawa hasil isolasi memberikan efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara manusia T47D. Menurut Cao *et al.* (1998), untuk senyawa murni digolongkan sangat aktif apabila memiliki nilai  $IC_{50} < 5 \mu\text{g/mL}$ , aktif  $5-10 \mu\text{g/mL}$ , sedang  $11-30 \mu\text{g/mL}$  dan tidak aktif  $>30 \mu\text{g/mL}$ . Untuk (-)- (epikatekin) (**2**) memberikan nilai  $IC_{50}$   $5,1 \mu\text{g/mL}$  dan dikategorikan sangat aktif, kowanin (**4**) dan rubrasanton (**5**) termasuk aktif dengan nilai  $IC_{50}$   $10,4 \mu\text{g/mL}$  dan  $13,5 \mu\text{g/mL}$ , dan asam 3-okso-23-hidroksisikloart-24-en-26-olat (**1**) termasuk sedang dengan nilai  $IC_{50}$   $17,3 \mu\text{g/mL}$ .

Pembandingnya adalah suatu senyawa kompleks platina yaitu cis-diklorodiamina platina II dikenal dengan nama *cis-platinum* (Thomas Nogrady, 1992) yang memberikan nilai  $IC_{50}$   $0,3 \mu\text{g/mL}$ . Data absorbansi dapat dilihat pada Lampiran 17.

#### 4.7. Hubungan Struktur-Aktivitas Senyawa Hasil Isolasi dari Genus *Garcinia*

Untuk mengkaji hubungan struktur-aktivitas juga dilakukan pengujian aktivitas sitotoksik senyawa dari spesies *Garcinia* lainnya yaitu senyawa **S1-S4** dari *G. forbesii*, senyawa **S5-S7** dari *G. griffithii* dan senyawa **S8** dari *G. bancana* dan senyawa **S9 dan S10** dari *G. nigroliniata*. Dari masing-masing senyawa uji ditentukan nilai  $IC_{50}$  seperti tertera pada Tabel 14.



Gambar 4.39. Struktur molekul senyawa-senyawa uji

Tabel 14. Data nilai IC<sub>50</sub> senyawa hasil isolasi dari genus *Garcinia*

No	Senyawa Uji	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
1	Asam 3 -okso-23-hidroksisikloart-24-en-26-oat (1)	17,3
2	(-)-epikatekin (2)	3,6
3	Kowanin (4)	10,4
4	Rubrasanton (5)	13,5
5	1,3,5-trihidroksi-7-metoksi-8-(3,7-dimetilokta-2,6-dienil)santon (S1)	13,6
6	1,3,5-trihidroksi-2-metoksi santon (S2)	11,9
7	Garsinidon A (S3)	5,06
10	1,7-dihidroksisanton (S4)	13,1
11	1,6-dihidroksi-3-metoksi-4-7-di(3-dimetilbut-2-enil)santon (S6)	7,6
12	1,5-dihidroksi-3,6-di-metoksi-4,7-di-(3-dimetilbut-2-enil)santon (S7)	10,1
13	Isosantosimol (S8)	6,6
14	1,7-dihidroksi-3-metoksi-4-(3-dimetilbut-2-enil)-6,6-dimetilpirano(2',3',6,5)santon (S9)	9,8
15	1,7-dihidroksi-6,6-dimetilpirano(2',3',6,5)santon (S10)	9,37
16	Cis- Pt	0,3

Dari Tabel 14 terlihat bahwa aktivitas tertinggi diberikan oleh (-)-epikatekin dengan nilai IC<sub>50</sub> 3,6 µg/mL diikuti oleh garsinisidon (S3) dengan IC<sub>50</sub> 5,06. (-)-epikatekin merupakan senyawa yang telah dikenal sebelumnya sebagai suatu senyawa antioksidan yang potensial (Deachatai *et al.*, 2005). Pada umumnya ada korelasi antara senyawa antioksidan dan antikanker, sehingga suatu senyawa antioksidan dapat dikembangkan menjadi suatu senyawa antikanker. Pencarian awal suatu senyawa antikanker biasanya dimulai dengan uji sitotoksik. Sifat sitotoksik yang tinggi dari (-)-epikatekin diduga karena memiliki jumlah gugus hidroksil yang banyak (lima gugus hidroksil). Semakin banyak jumlah gugus hidroksi maka aktivitas semakin tinggi. Hal ini terbukti dimana garsinisidon A (S3) yang hanya memiliki tiga gugus hidroksil menunjukkan aktivitas yang lebih rendah dari (-)-epikatekin (Soetrisno, 2000).

Selain jumlah gugus hidroksil, aktivitas sitotoksik juga dipengaruhi oleh unit prenil dan gugus metoksil. Hal ini terlihat

aktivitas senyawa **S8** lebih aktif ( 6,6 mg/mL ) dibandingkan dengan senyawa **S2** (11,9 mg/mL) dan **S5** (13,1 mg/mL). Berkurangnya gugus prenil menyebabkan penurunan aktivitas secara signifikan. Hal ini terbukti untuk nilai aktivitas sitotoksik untuk 1,6-dihidroksi-3-metoksi-4-7-di(3-dimetilbut-2-enil) santon (**S6**), 1,5-dihidroksi-3,6-di-metoksi-4,7-di-(3-di-metilbut-2-enil) santon (**S7**) 1,7-dihidroksi-3-metoksi-4-(3-dimetilbut-2-enil)-6,6-dimetilpirano(2',3',6,5) santon (**S9**) yang masing masing mempunyai dua unit prenil. Untuk senyawa **S6** yang hanya mempunyai satu gugus metoksil memberikan aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa **S7** dan **S9**. Hal ini membuktikan bahwa gugus metoksil memberikan pengaruh terhadap aktivitas sitotoksik. Hasil ini sesuai dengan pernyataan Ito *at al.* (2003), yang mengatakan bahwa jumlah gugus metoksil mempengaruhi aktivitas sitotoksik

Adanya unit geranil tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap aktivitas sitotoksik, hal ini terlihat dari nilai aktivitas yang ditunjukkan oleh kowanin dan rubrasanton dengan nilai  $IC_{50}$  berturut-turut 10,4 mg/mL dan 13,5mg/mL yang memberikan nilai  $IC_{50}$  yang hampir sama dengan **S7**. Untuk senyawa **1** memberikan nilai  $IC_{50}$  17,3 mg/mL dan dikategorikan mempunyai aktivitas sedang berdasarkan studi pustaka Vieira *et al.* (2004), juga telah melaporkan beberapa senyawa triterpenoid yang bersifat aktif sitotoksik yang diujikan terhadap *human tumor cell line* MCF-7 dengan nilai  $IC_{50}$  antara 15,3 – 26,0 mg/mL.

Uji sifat aktivitas sitotoksik dari senyawa hasil isolasi ini, menggunakan senyawa pembanding *cis*-platinum [  $(NH_3)_2Cl_2Pt$  ] yaitu suatu senyawa yang telah dikenal sebagai senyawa antitumor. Mekanisme senyawa ini ialah terjadinya interaksi antara *cis*-platinum dengan DNA melalui pengikatan dalam untaian sehingga tidak terjadi ikatan silang kedua untaian DNA pada rangkaian oligoguanin. Pengikatan senyawa Cisplatin pada untaian DNA ini menyebabkan terbukanya pilinan untaian ganda dan memendekkan molekul DNA, akibatnya replikasi dan trasnkripsi DNA terganggu ( Nogrady, 1992).



# 5

## KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian dan pembahasan diperoleh kesimpulan sebagai berikut :

1. Dari ekstrak etil asetat kulit batang *G. cornea* diperoleh tiga macam senyawa: dua golongan triterpen asam 3-okso-23-hidroksisikloart-24-en-26-oat (senyawa **1**, 80 mg) dan 3-okso-sikloart-24-en-23-ol (senyawa **3**, 7 mg), serta satu golongan flavan (-)-epikatekin (senyawa **2**, 10 mg). Dari ekstrak *n*-heksan kulit batang *G. cowa* diperoleh kowanin (senyawa **4**, 20 mg) dan dari ekstrak diklorometan rubrasanton (senyawa **5**, 800 mg) yang merupakan golongan santon.
2. Senyawa **1**, **2**, dan **3** merupakan senyawa yang pertama kalinya dilaporkan terkandung dari *G. cornea*, sedangkan senyawa **4** dan **5** merupakan senyawa yang telah ditemukan sebelumnya dari *G.cowa*.
3. Senyawa **1** memiliki aktivitas sitotoksik sedang, dengan nilai  $IC_{50}$  13,7  $\mu\text{g/mL}$  dan senyawa **2** termasuk aktif ( $IC_{50}$  3,6  $\mu\text{g/mL}$ ). Senyawa **4** dan **5** mempunyai aktivitas sitotoksik tergolong aktif ( $IC_{50}$  10,4 dan 13,5  $\mu\text{g/mL}$ ).
4. Aktivitas sitotoksik dipengaruhi oleh jumlah gugus fungsi hidroksil, jumlah posisi gugus frenil, jumlah metoksil, dan faktor sterik.
5. Rendemen yang menarik berasal dari senyawa **5**: dari 2 g ekstrak diklorometan melalui dua tahapan pemurnian diperoleh senyawa murni sebanyak 800 mg. *G. cowa* yang menghasilkan senyawa **5** merupakan tumbuhan sumber senyawa sitotoksik yang prospektif.

## 5.2. Saran

1. Dengan terungkapnya senyawa golongan triterpen dari *G. cornea* yang memiliki aktivitas sitotoksik sedang terhadap *human breast cancer cell line* T47D, membuka alur penelitian baru untuk pengembangan uji sitotoksik secara *in vivo*.
2. Dengan diperolehnya rendemen yang menarik dari senyawa **1** aktivitas sedang memungkinkan untuk dilakukan studi lanjut peningkatan aktivitas dengan cara sintesis parsial dari senyawa **1**.
3. Rendemen lain yang lebih menarik dari senyawa **1** adalah senyawa **5** (aktivitas aktif); dari senyawa ini memungkinkan untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai senyawa antikanker.
4. Adanya senyawa kowanin dan rubrasanton dari *G. cowa* yang memiliki aktivitas sitotoksik merupakan pembenaran dan nilai tambah penggunaan buah *G. cowa* (asam kandis) oleh masyarakat Sumatera Barat sebagai rempah-rempah dan manisan. Temuan ini dapat menjadi dasar untuk saran kepada pemerintah setempat agar *G. cowa* dan *Garcinia* lain perlu dilestarikan dan dibudidayakan sebagai tumbuhan endemik spesifik Sumatera.
5. Sehubungan dengan *G. mangostana* (manggu) terkenal di Jawa Barat dan kemotaksonomi *G. cornea*, *G. cowa*, dan *G. mangostana* yang berkaitan, menarik untuk disarankan kepada pemerintah Jawa Barat/Pemkot Bandung, agar penghijauan yang sedang digalakkan akhir-akhir ini tidak hanya menanam tumbuhan pelindung tapi dengan berbagai genus *Garcinia* yang keberadaannya hampir punah.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anjaneyulu, V., Satyanarayana, P., Viswanadham, K.N., Jyoti, V.G., Nageswa Rao, K., and Radhika, P. 1999. Triterpenoids from *Mangifera indica*. *Phytochemistry* **50**: 1229 -1236.
- Bennett, G.J., and Lee, H. H. 1989. Xanthonenes from Guttiferae . *Phytochemistry* **28**(4): 967-998.
- Boggett, S., Protiva, P., Mazzola, E.P., Yang, H., Ressler, E.T., Basile, M.J., Weinstein, I.B., and Kennelly, E.J. 2005. Bioactive Benzophenones from *Garcinia xanthochymus* Fruits. *Journal of Natural Products* **68**: 354-360.
- Cao, S.G., Valerie, H.L., Wu, X.H., Sim, K.Y., Tan, B.H.K., Pereira, J.T., and Goh, S.H. 1998. Novel Cytotoxic Polyprenylated Xanthonenes from *Garcinia gaudichaudii*. *Tetrahedron* **54**: 10915-10924.
- Chai, H.B., and Pezzuto, J.M. 1997. *In Vitro* Anticancer Drug Screening: Human Cancer Cell Line. 1-27.
- Chiang, Y.M., Kuo, Y.H., Oota, S., and Fukuyama, Y. 2003. Xanthonenes and Benzophenones from The Stems of *Garcinia multiflora*. *Journal of Natural Products* **66** : 1070 -1073.
- Deachatai, S., Mahabusarakam, W., Phongpaichit, S., and Taylor, W. C. 2005. Phenolic Compound from The Fruit of *Garcinia dulcis*. *Phytochemistry* **66**: 2368-2375.
- Gossel, T.A. and J.D. Bicker, 1990. Principles of Clinical Toxicology. 2<sup>nd</sup> edition. Raven Press. New York. 1-18.
- Gunatilaka, A.A.L., Sriyani, H.T.B., Sotheeswaran, S., and Waight, E.S., 1983. 2,5-dihydroxy-1,6-dimethoxyxanthonenes and Biflavonoids of *Garcinia Thwaitesii*. *Phytochemistry* **22**(1): 233-235.
- Hay, A.E., Helesbeux, J.J., Duval, O., Labaied, M., Grellier, P., and Richomme, P. 2004. Antimalaria Xanthonenes from *Calophyllum caledonicum* and *Garcinia vieillardii*. *Life Sciences* **75**: 3077-3085.
- Heyne, K. 1987. Tumbuhan Berguna Indonesia. Jilid III. Jakarta: Yayasan SaranaWana Jaya. 390.
- Ito, C., Itoigawa, M., Takakura, T., Ruangrunsi, N., Enjo, F., Tokuda, H., Nishino, H., and Furukawa, H. 2003. Chemical Constituents of *Garcinia fusca*: Structure Elucidation of Eight New Xanthonenes

- and Their Cancer Chemopreventive Activity. *Journal of Natural Products* **66**: 200-205.
- Ito, C., Itoigawa, M., Takakura, T., Mishina, Y., Tomiyasu, H., Litaudon, M., Casson, J.P., Mukainaka, T., Tokuda, H., Nishino, H., and Furukawa, H. 2001. Cancer Chemopreventive Agent New Depsidones from *Garcinia* Plants. 2001. *Journal of Natural Products* **66** : 206-209.
- Ji, X., Avula, B., and Khan, I.A. 2007. Quantitative and Qualitative Determination of Six Xanthenes in *Garcinia mangostana* L. By LC-PDA and LC-ESI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **43**: 1270-1276.
- Joseph, G.S., Jayaprakasha, G.K., Selvi, A.T.Jena, B.S., and Sakariah, K.K. 2005. Antiaflatoxicogenic and Antioxidant Activities of *Garcinia* Extracts. *International Journal of Food Microbiology* **101**: 153-160.
- Kardono, L.B.S., Hanafi, M., Sherley, G, Kosela, S., and Harrison, L.J. 2006. Bioactive Constituents of *Garcinia porrecta* and *Garcinia parvifolia* Grown in Indonesia. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **9** (3): 483-486.
- Komguem, J., Meli, A.L., Manfouo, R.N., Lontsi, D., Ngoounou, F.N., Kuete, V., Kamdem, H.W., Tane, P., Ngajui, B.T., Sondengam, B.L., and Connolly, J.D. 2005. Xanthenes from *Garcinia smeathmannii* (Oliver) and Their Antimicrobial Activity. *Phytochemistry* **66**: 1713-1717.
- Lannang, A.M., Komguem, J., Ngoounou, F.N., Tangmouo, J.G., Lontsi, D., Ajaz, A., Choudhary, M.I., Ranjit, R., Devkota, K.P., and Sondengam, B.L. 2005. Bangangxanthone A and B, Two Xanthenes from The Stem Bark of *Garcinia polyantha* Oliv. *Phytochemistry* **66**: 2351-2355.
- Likhitwitayawuid, K., Phadungcharoen, T., Mahidol, C., and Ruchirawat, S. 1997. 7-O-methylgarcinon E from *Garcinia cowa*. *Phytochemistry* **45**: 1299-1301
- Mahabusarakam W, Chairerk P, and Taylor W.C. 2005. Xanthenes from *Garcinia cowa* Roxb. Latex. *Phytochemistry* **66** :1148-1153.
- Maheswari, J.K., 1968. Bulletin of the Botanical Survey of India. Taxonomic Studies on Indian Guttiferae. James Cook University Library. 122-123.

- Markham, K.R., and Ternai, B. 1976.  $^{13}\text{C}$  NMR of Flavonoids-II. *Tetrahedron* **32**: 2607-2612.
- Merza, J., Aumond, M.C., Rondeau, D., Dumontet, V., Le Ray, A.M., Seraphin, D., and Richomme, P. 2004. Prenylated Xanthones and Tocotrienols from *Garcinia virgata*. *Phytochemistry* **65**: 2915-2920.
- Na Pattalung, P., Thongtheeraparp, W., Wiryachitra, P., and Taylor, W.C. 1994. Xanthones of *Garcinia cowa*. *Journal Planta Medica* **60**: 365-368.
- Nilar, Lien-Hoa, D., Nguyen, Venkatraman, G., Sim, K.Y., and Harrison, L.J. 2005. Xanthones and Benzophenon from *Garcinia griffithii* and *Garcinia mangostana*. *Phytochemistry* **66**: 1718-1723.
- Nogrady, Th. 1992. Kimia Medisinal Pendekatan Secara Biokimia. Terbitan Kedua. Bandung. Penerbit ITB. 514-515.
- Panthong, K, Pongcharoen, W., Phongpaichit, W., and Taylor, W.C. 2006. Tetraoxygenated Xanthones from The Fruit of *Garcinia cowa*. *Phytochemistry* **67**: 999 -10043.
- Permana, D., Lajis, N.H., Mackeen, M.M., Ali, A.M., Aimi, N., Kitajima, M., and Takayama, H. 2001. Isolation and Bioactivities of Constituents of The Roots of *Garcinia atroviridis*. *Journal of Natural Products* **64** : 976 -979.
- Rukachaisirikul, V., Naklue, W., Sukpondma and Phongpaichit, S. 2005. An Antibacterial Biphenyl Derivative from *Garcinia parvifolia bancana* Miq. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **53**: 342-343.
- Rukachaisirikul, V., Naklue, W., Phongpaichit, S., Towatana, N.H., and Maneenoon, K., 2006. Phloroglucinols, Depsidones and Xanthones from The Twigs of *Garcinia parvifolia*. *Tetrahedron* **62**: 8578-8585.
- Sari, R. 2005. Pengembangan *Garcinia atroviridis* Griff. Ex T. Anders. (Clusiaceae) Sebagai Bahan Penurun Berat Badan. Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia 1-5.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., and Boyd, M.R. 1990. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *Journal of the National Cancer Institute* **82**(13): 1107-1112.

- Suksamrarn, S., Suwannapoch, N., Ratanukul, P., Aroonlerk, and Suksamrarn, A. 2002. Xanthenes from The Green Fruits Hull of *Garcinia mangostana*. *Journal of Natural Products* **65**: 761-763.
- Suksamrarn, S., Suwannapoch, N., Phakhodee, W., Thanuhiranlert, J., Ratanukul, P., Chimnoi, N., and Suksamrarn, A. 2003. Antimicrobial Activity of Prenylated Xanthenes from The Fruits of *Garcinia mangostana*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **51**(7): 857-859.
- Sutrisno . 2000. Aktivitas Pakirizin dan Turunannya terhadap Pertumbuhan Sel Leukemia L1210 . Disertasi Program Doktor. Institut Teknologi Bandung
- Thoison, O., Fahy, J., Dumontet, V., Chiaroni, A., Riche, C., Tri, M.V., and Sevenet, T. 2000. Cytotoxic Prenylxanthenes from *Garcinia bracteata*. *Journal of Natural Products* **63**: 441-446.
- Vieira, L.M.M., Kijjoa, A., Wilairat, R., Nascimento, M.S.J., Gales, L., Damas, A.M., Silva, A.M.S., Mondranondra, I.O., and Herz, W. 2004. Bioactive Friedolanostanes and 11 (10-8)-Abeolanostanes from The Bark of *Garcinia speciosa*. *Journal of Natural Products* **67**: 2043-2947.
- Wahyuni, F.S., Lajis, N.H., Stanslas, J., Ali, D.A.I., Shaari, K. and Dachriyanus. 2004a. Isolation of Bioactive Compounds from *Garcinia cowa* Roxb. 14<sup>th</sup> Indonesian National Symposium on Natural Products Chemistry . Bandung 16-17<sup>th</sup> December 2004.
- Wahyuni, F.S., Byrne, L.T., Dachriyanus, Dianita, R., Jubahar, J., Lajis, N.H., and Sargent, M.V. 2004b. A New Ring-Reduce Tetraprenyltoluquinone and A Prenylated Xanthone from *Garcinia cowa*. *Australian Journal Chemistry* **57**: 223-226.
- Wahyuni, F.S., Jubahar, J., Dianita, R., Dachriyanus, Lajis, N.H., and Sargent, M.V. 2003a. Biological Activity and Chemical Constituents Studies of *Garcinia cowa*. National Symposium on Natural Product XIII. Structural Bioorganic Chemistry for Indonesia. Padang 2003.
- Wahyuni, F.S., Lajis, N.H., Ali, D.A.I., Stanslas, J., and Dachriyanus. 2003b Cytotoxic Screening on Crude Methanolic Extracts of Some Spesies *Garcinia*. *Garcinia* Nasional Seminar. Andalas University . Padang.
- Whitmore, T. C. 1973. Tree Flora of Malaya, A Manual for Foresters. Vol 2. Longman Group Limited London.

- Wu, C.C., Weng, J.R., Won, S J., and Lin, C.N. 2005. Constituents of the Pericarp of *Garcinia subelliptica*. *Journal of Natural Products* **68**: 1125-1127.
- Xu Y.J., Chiang P.Y., Lai Y.H., Vittal J.J., Wu X.H., Tan B.K.H., Imiyabir and Goh S.H. 2000. Cytotoxic Prenylated Depsidones from *Garcinia parvifolia*. *Journal of Natural Products* **63**: 1361-1363.
- Yang K.C., Uen Y.H., Suk F.M., Liang Y.C., Wang Y.J., Ho Y.S., Li I.H., and Lin S.Y. 2005. Molecular Mechanisms of Denbinobin-Induced Anti-Tumorigenesis Effect in Colon Cancer Cell. *World Journal of Gastroenterology* 3041 -3043.

