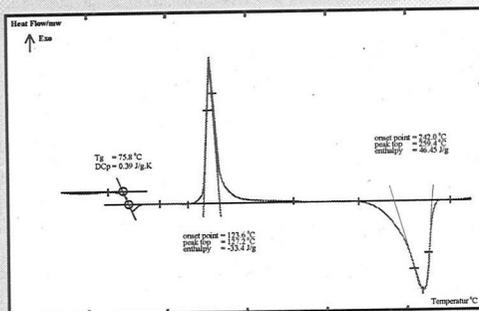
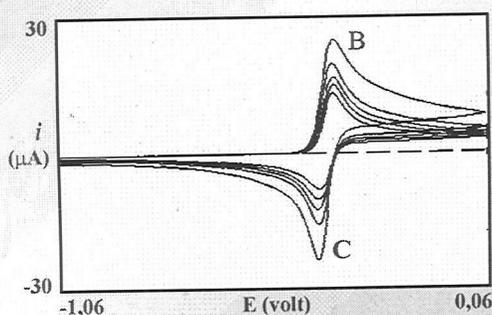


ANALISIS DAN KARAKTERISASI SENYAWA KIMIA

Suatu Seri Monograf



Penyunting: Sutopo Hadi dan Sonny Widiarto

**JURUSAN KIMIA FMIPA
UNIVERSITAS LAMPUNG**

Bandar Lampung
2007

ANALISIS DAN KARAKTERISASI SENYAWA KIMIA

Suatu Seri Monograf

ISBN 978-979-15222-1-2

Ukuran buku / Book size: 15,5 cm x 23 cm
Jumlah halaman / Total pages: 322 Halaman

Penyunting:
Sutopo Hadi, M.Sc., Ph.D.
Sonny Widiarto, S.Si., M.Sc.

Gambar kulit / Cover designer:
Sonny Widiarto dan Sutopo Hadi

Diterbitkan oleh / Published by:
Jurusan Kimia Fakultas MIPA
Universitas Lampung

Copy right 2007@Jurusan Kimia
Hak Cipta dilindungi Undang-undang

Cetakan pertama Juni 2007

Dicetak oleh / Printed by:
Kimia Press dan AMI Press

SAMBUTAN KETUA JURUSAN

Dengan mengucapkan puji syukur ke khadirat Allah SWT yang telah melimpahkan taufik, hidayah dan pertolongannya, Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung dapat menyelesaikan monograf yang kedua dengan judul "**Analisis dan Karakterisasi Senyawa Kimia**",

Penerbitan monograf ini merupakan salah satu bentuk ungkapan rasa terimakasih segenap civitas akademika Jurusan Kimia kepada Bapak **Maizar Syafar**, almarhum atas jasa dan pengabdian beliau yang sangat besar bagi pengembangan Jurusan Kimia hingga mencapai keadaan sekarang ini..

Monograf ini dapat tersusun dengan bantuan berbagai pihak, oleh karena itu pada kesempatan ini atas nama Jurusan Kimia saya dengan tulus menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada para staf pengajar yang telah menyumbangkan tulisan untuk monograf ini.

Jurusan Kimia menyadari bahwa penulisan monograf ini masih jauh dari sempurna, baik materi maupun tata bahasanya. Untuk itu kami mengharapkan saran dan kritik yang membangun dari pembaca guna untuk meningkatkan kemampuan Jurusan Kimia di masa yang akan datang..

Semoga monograf ini bermanfaat bagi pihak-pihak yang memerlukannya.

Bandar Lampung, Juni 2007.

Ketua Jurusan Kimia,

Dr. Hardoko Insan Qudus, M.S.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah kami memanjatkan puja dan puji syukur kepada Allah SWT yang telah memberikan pertolongan dan kemudahannya kepada kami, sehingga proses penyuntingan monograf yang kedua ini, dapat kami selesaikan. Monograf Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung yang kedua ini, ditulis untuk mengenang jasa dan pengorbanan Bapak **Maizar Syafar** dalam membantu mengembangkan Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung, hingga bisa seperti sekarang ini. Sehingga, sebagai balas jasa kami atas pengorbanannya tersebut, buku monograf ini kami beri judul "**Analisis dan Karakterisasi Senyawa Kimia**".

Buku seri monograf ini memuat 21 tulisan yang semuanya ditulis berdasarkan latar belakang dan bidang ilmu masing-masing penulis. Kelima *Peer Group* klasik yang biasanya terdapat pada setiap Jurusan Kimia di universitas yang ada di Indonesia, semuanya memberikan kontribusi. Tulisan pada monograf kedua ini diawali dari bidang Kimia Organik (sesuai dengan bidang ilmu almarhum Maizar syafar) yaitu tentang Karakterisasi Beberapa Senyawa Flavonoid Trioksigenasi o-, m-, dan p- pada Cincin B dari Tumbuhan *Artocarpus* secara Spektrofotometri UV-VIS yang ditulis oleh Tati Suhartati. Masih dari bidang ini, Verita Yudi, Suropto Dwi Yuwono, Andi Setiawan dan Noviany juga menurunkan tulisannya serta Ratu Betta Rudibyani (Pendidikan Kimia Jurusan MIPA FKIP).

Tulisan dari Kimia Analitik diawali oleh Hardoko Insan Qudus yang membahas Analisis Voltammogram Siklik Zat Pengalkil Antikanker yang Mengikuti Mekanisme Reaksi EC Menggunakan Perangkat Lunak Polar 3.3. R. Supriyanto dan Sonny Widiarto kembali berpartisipasi dengan menyumbangkan tulisan terbaru hasil penelitian mereka.

Peer Group Kimia Fisik menyumbangkan 4 buah karya tulis mereka, yang dimulai oleh Wasinton Simanjuntak yang membahas Fraksinasi dan Karakterisasi Senyawa Humat dengan Metode Pirolisis. John Hendri, Irwan Ginting Suka serta Kamisah D. Pandiangan dan Wasinton Simanjuntak juga turut serta memberikan kontribusi tulisannya.

Bidang Biokimia pada kesempatan ini menurunkan 5 buah tulisan. Yandri A.S. membahas Karakterisasi Enzim α -Amilase Hasil Modifikasi Kimia dari Bakteri Isolat Lokal

Bacillus subtilis ITBCCB148. Selain itu, dan Nurhasanah, Dian Herasasi, Aspita Laila bersama John Hendri dan Irwan Ginting Suka serta Mulyono juga memberikan tulisan terbaru mereka.

Terakhir, dari Bidang Kimia Anorganik, pada monograf ini menyumbangkan 3 tulisan. Sutopo Hadi menurunkan tulisan tentang Analisis dan Karakterisasi dengan Spektroskopi IR dan Uv-Vis serta Uji Antifungi Senyawa Dibutil- dan Difeniltimah(IV) Karboksilat, diikuti dengan Karakterisasi Gugus Fungsi untuk Memprediksi Interaksi Ion Logam pada Biomassa *Sargassum sp* oleh Buhani dan Suharso. Mita Rilyanti membahas Sintesis dan Karakterisasi Senyawa Co(II) Menggunakan Ligan Bidentat Berjembatan (Disianamida dan 2,2'-Bipirimidin).

Kami sebagai penyunting, mengucapkan terima kasih kepada para penulis karena tanpa keinginan dari para penulis untuk menyumbangkan tulisannya, maka kami tak berarti apa-apa dan tidak dapat berbuat banyak dalam merealisasikan penyusunan monograf ini. Terima kasih kami sampaikan juga kepada semua pihak yang telah membantu proses penyuntingan ini sehingga akhirnya monograf ini dapat terealisasi. Kami menyadari bahwa penyuntingan monograf ini masih jauh dari sempurna, baik tata bahasa maupun tataletaknya, untuk itu kami mengharapkan saran dan kritik yang membangun dari pembaca guna penyempurnaan penerbitan monograf Jurusan Kimia di masa yang akan datang.

Akhir kata, semoga monograf yang kedua ini mempunyai makna tersendiri bagi keluarga besar Bapak Maizar Syafar, dan tentu saja harapan terbesar kami adalah monograf ini dapat memenuhi harapan pembaca dan memberikan manfaat sebesar-besarnya bagi pihak-pihak yang memerlukannya.

Bandar Lampung, Juni 2007

Penyunting,

Sutopo Hadi dan Sonny Widiarto

DAFTAR ISI

Sambutan Ketua Jurusan Kimia

Kata Pengantar

1. Karakterisasi Beberapa Senyawa Flavonoid Trioksigenasi O-, m-, dan p- pada Cincin B dari Tumbuhan <i>Artocarpus</i> secara Spektrofotometri UV-VIS Tati Suhartati	1
2. Karakterisasi Senyawa Humat dengan Metode Spektroskopi Verita Yudi	15
3. Analisis Voltammogram Siklik Zat Pengalkil Antikanker yang Mengikuti Mekanisme Reaksi EC Menggunakan Perangkat Lunak Polar 3.3 Hardoko Insan Qudus	26
4. Karakterisasi Senyawa Bioaktif dari Biota Laut sebagai MDR Modulator Andi Setiawan	48
5. Fraksinasi dan Karakterisasi Senyawa Humat dengan Metode Pirolisis Wasinton Simanjuntak	64
6. Karakterisasi Enzim α -Amilase Hasil Modifikasi Kimia dari Bakteri Isolat Lokal <i>Bacillus subtilis</i> ITBCCB148 Yandri A.S	83
7. Analisis dan Karakterisasi dengan Spektroskopi IR dan Uv-Vis serta Uji Antifungi Senyawa Dibutil- dan Difeniltimah(IV) Karboksilat Sutopo Hadi	100
8. Karakterisasi Polimer dengan <i>Differential Scanning Calorimetry</i> (DSC) Sonny Widiarto	113
9. Sintesis dan Karakterisasi Membran Penukar Proton Sel Bahan Bakar dengan Teknik Radiasi Grafting Irwan Ginting Suka	131
10. Penentuan Bobot Molekul Senyawa Humat Larut Air dengan Metode <i>High Performance Size Exclusion Chromatography</i> (HPSEC) Kamisah D. Pandiangan dan Wasinton Simanjuntak	150
11. Pembuatan dan Karakterisasi Biodiesel Metil Ester sebagai Bahan Bakar Alternatif yang Ramah Lingkungan R. Supriyanto	164

12. Karakterisasi dan Analisis Kandungan Senyawa Kitin John Hendri	179
13. Konversi Bioteknologi dari Sumber Terbaharukan Menjadi Asam Laktat Suripto Dwi Yuwono	188
14. Karakterisasi dan Analisis Sifat Fisikokimia Enzim Lipase Nurhasanah	199
15. Analisis dan Karakterisasi Enzim Protease dari Bakteri Dian Herasari	216
16. Sintesis dan Karakterisasi Senyawa Co(II) Menggunakan Ligan Bidentat Berjembatan (Disianamida dan 2,2'-Bipirimidin) Mita Rilyanti	230
17. Karakterisasi Gugus Fungsi untuk Memprediksi Interaksi Ion Logam pada Biomassa <i>Sargassum sp</i> Buhani dan Suharso	243
18. Kajian Aktivitas Biologis Senyawa-Senyawa Metabolit Sekunder Tumbuhan Dipterocarpaceae yang Berpotensi sebagai Antitumor, Suatu Studi Awal Hubungan Struktur dan Aktivitas Senyawa Noviany	255
19. Teknologi dan Aplikasi Kitin dan Kitosan Aspita Laila, John Hendri dan Irwan Ginting Suka	280
20. Karakterisasi Glukosa Ratu Betta Rudibyani	295
21. Analisis Biokonversi Aniline dan Senyawa Derivatnya oleh <i>Bacillus Cereus</i> Strain 10-L-2 Menggunakan HPLC dan GC-MS Mulyono	303

04 KARATERISASI SENYAWA BIOAKTIF DARI BIOTA LAUT SEBAGAI MDR MODULATOR

Andi Setiawan

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung

I	Pendahuluan	48
II	Senyawa Bioaktif.....	50
III	MDR Modulator	54
	A. Mekanisme Pgp dan MRP1	55
	B. Mekanisme MDR Modulator.....	57
	C. Uji MDR Modulator.....	58
IV	Keragaman Struktur MDR Modulator	60
V	Kesimpulan.....	61
	Daftar Pustaka.....	62

I Pendahuluan

Bahan alam merupakan sumber senyawa bioaktif yang sangat diandalkan untuk pengembangan industri dimasa datang. Penggunaan bahan alam khususnya dari ekstrak tanaman tinggi sebagai bahan utama sediaan obat di negara-negara maju telah mencapai kurang lebih 25% dari total sediaan obat yang diperdagangkan (Joffe & Thomas, 1989). Hingga saat ini, upaya untuk mendapatkan senyawa bioaktif baru terus dilakukan secara intensif. Dalam dua dekade terakhir, keragaman struktur senyawa kimia bahan alam laut mendapat perhatian dari para peneliti diberbagai disiplin ilmu meliputi biologi laut, ekologi laut, biokimia, kimia dan farmasi guna memahami karakteristik dan manfaat senyawa tersebut. Perkembangan ilmu bahan alam yang didukung dengan kemajuan sains dan teknologi saat ini, merupakan garis terdepan dari penelitian pencarian senyawa bioaktif baru untuk berbagai tujuan. Kajian literatur dari hasil-hasil penemuan senyawa metabolit dari bahan alam yang khususnya diperoleh dari laut telah dilaporkan oleh Faulkner (2001).

Senyawa metabolit diklasifikasikan dalam dua kelompok besar yaitu metabolit primer dan sekunder. Senyawa metabolit primer sangat esensial untuk pertumbuhan dan kehidupan sistem suatu mahluk hidup dan dibentuk melalui sejumlah reaksi metabolik tertentu. Senyawa metabolite primer berfungsi sebagai *building blocks* untuk pembentuk senyawa makromolekul, protein, asam nukleat, karbohidrat dan lipid. Berbeda dengan senyawa metabolit sekunder tidak esensial untuk kehidupan yang berkaitan

04 KARATERISASI SENYAWA BIOAKTIF DARI BIOTA LAUT SEBAGAI MDR MODULATOR

dengan pertumbuhan ataupun reproduksi bagi organisme penghasil dan senyawa metabolite sekunder dihasilkan dari senyawa metabolit primer. Untuk saat ini fungsi dan peran senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan suatu organisme masih belum jelas secara pasti, namun telah diketahui bahwa beberapa organisme yang senyawa metabolit sekunder dapat meningkatkan keberadaannya di alam. Sebagai contoh beberapa senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan suatu organisme dapat berperan sebagai senjata kimia untuk mempertahankan diri dari bakteri, fungi dan menghindari ancaman dari predator organisme lain. Sebagian besar ketertarikan industri farmasi diutamakan pada senyawa metabolit sekunder, namun akhir-akhir ini ketertarikan industri farmasi terus berkembang kearah senyawa metabolit primer seperti marine lipids, enzim dan senyawa kompleks heteropolisakarida.

Eksploitasi senyawa bahan alam laut sebagai sumber senyawa bioaktif seringkali menghadapi kesulitan untuk mengakses biota laut yang ada disuatu perairan serta sulitnya mendapatkan jumlah sampel yang memadai untuk di uji coba di laboratorium. Beberapa upaya untuk membudidayakan biota laut untuk mendapatkan sumber yang memadai juga tidak mudah dilakukan. Salah satu contoh adalah senyawa bryostatin, budidaya akuakultur dilakukan untuk mengatasi permasalahan keterbatasan bahan aktif. Bryostatin merupakan suatu senyawa kompleks polisiklik dengan struktur polieter dihasilkan oleh bryozoa, *Bugula neritina*, yang telah dapat dibudidaya dalam tangki berukuran 5000 liter.

Beberapa laporan hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa metabolit pada kenyataannya dapat dihasilkan oleh mikroorganisme yang bersimbiosis dengan spesies tertentu dari biota laut. Salah satu contoh yang telah dibuktikan adalah senyawa tetrodotoxin (fugupoisin) yang memiliki sifat sebagai neurotoxin dan dapat menyebabkan kematian ikan di laut. Hasil kajian secara sistematis menunjukkan bahwa tetrodotoxin dihasilkan oleh beberapa strain bakteri laut. Saat ini telah dipahami bahwa sesungguhnya tetrodotoxin hanya dihasilkan oleh bakteri yang terakumulasi pada berbagai jenis ikan melalui rantai makanan. Contoh lain seperti senyawa-senyawa metabolit sekunder yang telah berhasil di isolasi dari sponge juga diduga berasal dari mikroorganisme.

Untuk membatasi topik bahasan, dalam monograf ini hanya akan dibahas mengenai karakterisasi beberapa senyawa bioaktif yang diperoleh dari biota laut khususnya yang berasal dari perairan Indonesia seperti perairan Kendari, Flores, Teluk

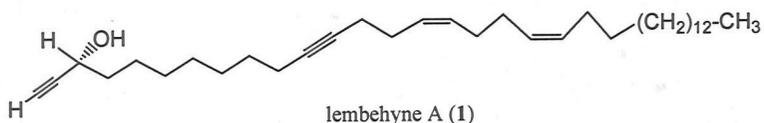
04 KARATERISASI SENYAWA BIOAKTIF DARI BIOTA LAUT SEBAGAI MDR MODULATOR

Lampung dan Krakatau. Namun untuk sifat bioaktivitasnya lebih diarahkan pada senyawa MDR modulator.

II Senyawa Bioaktif

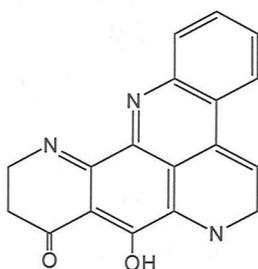
Laut memiliki peran penting bagi kehidupan manusia sebagai sumber makanan, energi, dan konservasi lingkungan. Selain peran tersebut, laut juga memiliki potensi sebagai sumber senyawa bioaktif yang potensial untuk menunjang pengembangan industri farmasi dan bioteknologi. Indonesia memiliki lebih dari 17,000 pulau yang terdistribusi di sepanjang garis katulistiwa. Kondisi geografi tersebut merupakan salah satu faktor yang menyebabkan perairan Indonesia kaya akan keanekaragaman biota laut seperti *sponge*, *soft coral*, *tunicate* dan lain-lainnya. Namun, pemahaman akan distribusi keragaman biota laut dan potensi senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh biota laut tersebut masih sangat terbatas. Kondisi perairan Indonesia yang memiliki keragaman biota laut juga berarti merupakan sumber potensial untuk keragaman senyawa bioaktif baru. Berbagai kelompok peneliti asing dan Indonesia telah berupaya menggali potensi biota laut di Indonesia untuk mendapatkan senyawa bioaktif baru dari biota laut di perairan Indonesia. Pada saat ini kajian senyawa bioaktif yang bersumber dari biota laut lebih difokuskan untuk mendapatkan obat baru khususnya senyawa anti kanker.

Lembehyne A (1) merupakan salah satu contoh senyawa baru poliasetilen yang memperlihatkan efek neurogenik terhadap sel PC12. Senyawa 1 memiliki keunikan pada 2 buah gugus ikatan rangkap tiga yang terdapat pada rantai hidrokarbon. Stereostruktur dari senyawa 1 ditentukan dengan menggunakan metoda Mosher dan analisis CD Spektrum. Senyawa 1 merupakan hasil isolat sponge yang diperoleh dari perairan Selat Lembeh, Bitung (Aoki *et al.*, 2000)



04 KARATERISASI SENYAWA BIOAKTIF DARI BIOTA LAUT SEBAGAI MDR MODULATOR

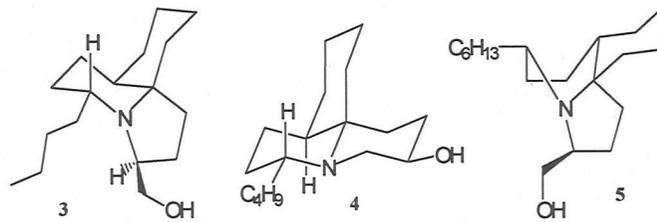
Labuanine A (2), merupakan senyawa alkaloid pyridoacridine yang memiliki aktifitas yang mampu menginduksi perubahan sel syaraf pada Neuro 2A (*a murine neuroblastoma cell line*). Berdasarkan hasil elusidasi struktur khususnya interpretasi data spektroskopi NMR menunjukkan keunikan struktur **2** terlihat adanya gugus hidroksi pada C₈ dan gugus keton pada C₉. Senyawa alkaloid yang telah dilaporkan sebelumnya, gugus keton terdapat pada C₈ sedangkan pada C₉ mengikat gugus NH₂. Senyawa ini diperoleh dari sponge yang berhasil dikoleksi di daerah perairan Krakatau. Elusidasi struktur senyawa **2** lebih di dasari pada interpretasi data spektroskopi NMR dan FAB Mass



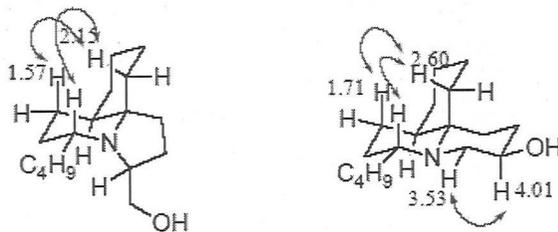
labuanine A (2)

Polycitorol A(3) dan B(4), Senyawa trisiklik alkaloid merupakan karakteristik dari cylindricine, lepadiformine (5) dan fascicularin. Senyawa tersebut merupakan metabolit yang unik dari *ascidian*. Struktur cylindricines A dan B sebelumnya telah berhasil diisolasi dari *Clavelina cylindrical* yang merupakan kelompok pertama dari turunan sistem cincin dari perhydropyrrolo [2,1-]quinolin dan perhydropyrido[2,1-]quinolin. Struktur dan stereokimia senyawa tersebut ditentukan dengan pengukuran kristal secara X-ray. Senyawa tersebut memiliki sifat toksik terhadap *brine shrimps* sedangkan senyawa **5** menunjukkan sifat sitotoksik terhadap beberapa jenis sel tumor dan hasil uji secara *in vivo* maupun *in vitro* menunjukkan aktivitas terhadap uji cardiovascular. Polycitorol A dan B merupakan senyawa yang bersifat toksik terhadap *brine shrimps*.

04 KARATERISASI SENYAWA BIOAKTIF DARI BIOTA LAUT SEBAGAI MDR MODULATOR



Keunikan dari struktur polycitorol A (3) dan B (4) terletak pada susunan penggabungan senyawa trisiklik. Untuk membedakan susunan senyawa 3 dan 4 dilakukan dengan pengujian NOE. Peningkatan signal H-2 pada pergeseran kimia δ 2.97 dan H-4_{ax} pada δ 1.57 selama dilakukan iradiasi H-9_{ax} pada δ 2.15 membuktikan bentuk penggabungan *cis* antara cincin A dan B untuk senyawa 3 (Issa *et al.*, 2005).



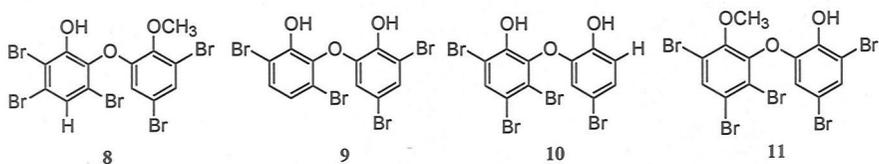
Gambar 1 Penggunaan uji NOE membuktikan bentuk penggabungan *cis* antara cincin A dan B untuk senyawa 3.

Rantai samping alil pada C-2 menempati posisi β equatorial berdasarkan pada hasil pengujian NOE untuk peningkatan signal antara H-2 dan H-5. Lebih lanjut, hasil pengujian NOE untuk salah satu proton H-12 dan H-13 menunjukkan besarnya kemungkinan bahwa gugus alkohol pada struktur merupakan alkohol primer.

Untuk memahami keunikan dari satu struktur senyawa bioaktif yang berkaitan dengan bioaktivitas yang dimiliki senyawa tersebut maka kajian secara intensive perlu dilakukan. Salah satu pendekatan yang sering dilakukan adalah memahami hubungan antara struktur dengan aktifitasnya atau lebih dikenal dengan SAR (*structure activity relationship*). Akhir-akhir ini, melalui kajian yang intensif telah berhasil diisolasi empat

04 KARATERISASI SENYAWA BIOAKTIF DARI BIOTA LAUT SEBAGAI MDR MODULATOR

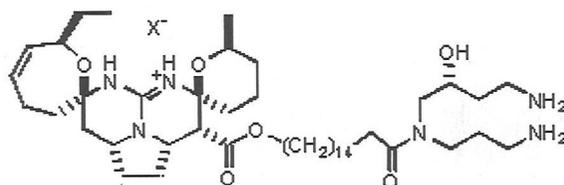
senyawa baru (8-11) bersama 10 senyawa polybrominated difenil eter. Senyawa ini diperoleh dari hasil isolasi sponge *Lamellodysidea herbacea*.



Karakterisi struktur baru dari keempat senyawa ini diperoleh dari hasil interpretasi data spektroskopi dan transformasi kimia. Senyawa-senyawa metabolit tersebut memperlihatkan aktivitas sebagai antimikrobal khususnya terhadap *Bacillus subtilis* dan juga memperlihatkan aktivitas yang moderat terhadap epitelial sel NBT-T2. Lebih lanjut, hasil kajian menggunakan pendekatan hubungan antara struktur dan aktivitas menunjukkan bahwa adanya dua gugus hidroksi fenol dan bromida pada struktur 9 sangat penting untuk memperlihatkan sifat aktifitas sebagai antimikrobal (Hanif *et al.*, 2007)

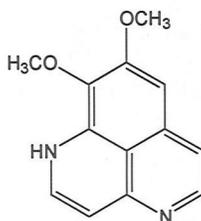
Senyawa-senyawa seperti polycitorol, lembehyne dan pyridoacridine hanya merupakan beberapa contoh dari senyawa bioaktif baru yang telah berhasil di isolasi dari berbagai jenis biota laut di perairan Indonesia. Namun untuk saat ini upaya untuk memanfaatkan senyawa bioaktif dari biota laut tidak selalu terfokus pada senyawa-senyawa baru saja. Melalui program perkembangan metoda skrining sangat memungkinkan untuk mendapatkan selektifitas suatu senyawa bioaktif terhadap target yang diinginkan.

Crambescidin 800 (6) merupakan senyawa yang sebelumnya telah dilaporkan. Namun sejalan dengan berkebangnya teknologi skrining, senyawa 6 ternyata diketahui memiliki aktifitas yang sangat spesifik terhadap diferensiasi sel K562 dan sebelumnya belum pernah dilaporkan (Aoki *et al.*, 2004).



crambescidin 800

Hal yang hampir sama terbukti pula pada **Aptamine (7)**, senyawa ini sebelumnya hanya diketahui memiliki sifat bioaktivitas sebagai senyawa anti bakteri. Namun setelah melalui beberapa tahapan uji bioaktivitas ternyata senyawa **7** secara selektif berinteraksi dengan Cdk-cyclin untuk peningkatan pembentukan p21 sehingga siklus sel yang tidak terkontrol dapat dihentikan. (Aoki *et al.*, 2006). Sedangkan bentuk senyawa demetoksi aptamine menunjukkan sifat sebagai MDR modulator terhadap KBC2 dengan tingkat moderat (Setiawan, 2004)



aptamine (7)

III MDR Mudulator

Pengembangan penelitian senyawa bahan alam laut khususnya berkenaan dengan senyawa bioaktif di masa datang juga diarahkan untuk mengatasi permasalahan yang sedang berkembang pada saat ini seperti *Multidrug resistance* (MDR) Fenomena MDR merupakan salah satu faktor yang menghambat keberhasilan kemoterapi. Mekanisme utama terjadinya resistensi suatu sel terhadap berbagai jenis obat anti kanker yang memiliki struktur dan fungsi berbeda disebabkan oleh kelebihan penampakan membran transporter Pgp. Senyawa seperti kendarimide A, briantein A, dan Agosterol A diketahui memiliki aktifitas sebagai penghambat fungsi Pgp dalam sel MDR.

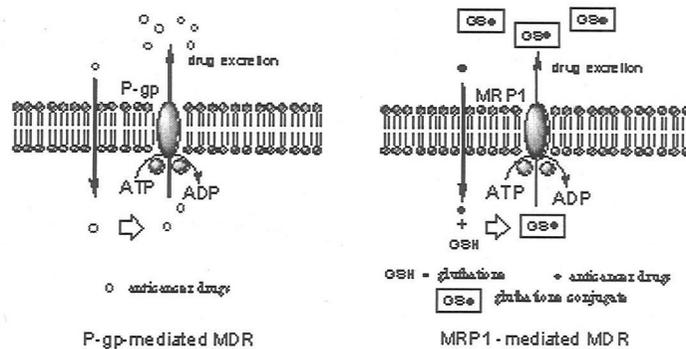
04 KARATERISASI SENYAWA BIOAKTIF DARI BIOTA LAUT SEBAGAI MDR MODULATOR

Fenomena resistensi sel tumor terhadap berbagai jenis senyawa antikanker yang berbeda struktur dan fungsi merupakan salah satu permasalahan utama dalam hal pengobatan penyakit kanker. Melalui kajian secara intensif terbukti bahwa P-gp dan MRP1 merupakan membran transporter yang dapat dijadikan target untuk mengatasi fenomena resistensi sel tumor terhadap berbagai jenis senyawa antineoplastik (Ford & Hait, 1990). Walaupun beberapa mekanisme yang mendasari terjadinya gejala tersebut telah diketahui seperti kelebihan penampakan P-glikoprotein (Endicott & Ling, 1989) dan *multidrug resistance-associated protein* (MRP1) (Cole *et al.*, 1992). Namun upaya untuk mendapatkan senyawa *reversal agents* atau MDR modulator masih belum optimal.

A. Mekanisme Pgp dan MRP1

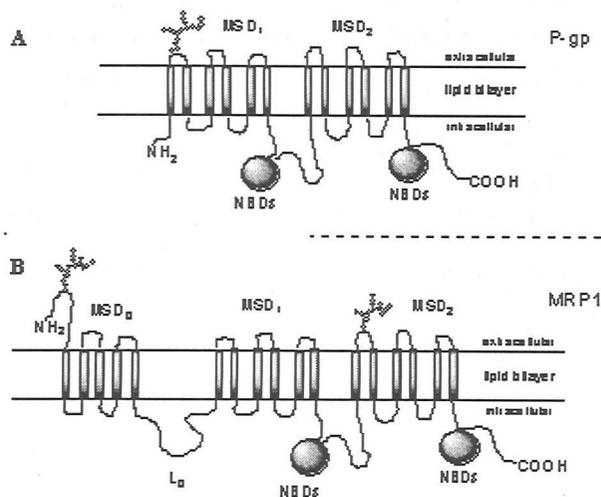
P-gp adalah 170 kDa *trans-membrane glycoprotein* yang merupakan bagian kelompok besar *ATP binding cassette (ABC) transporter*. P-gp mampu memindahkan substrate dengan memanfaatkan energi dari hasil hidrolisis ATP. Pada tahun 1992, Cole telah berhasil membuktikan bahwa kelebihan penampakan P-gp berkaitan dengan resistensi sel tumor. MRP1 merupakan *trans-membrane glycoprotein* 190 kDa yang juga termasuk bagian dari kelompok besar *ABC transporter* dan dikenal sebagai GS-X pump. MRP1 mampu berfungsi sebagai transporter senyawa konyugasi glutation dan glukoronat (Rappa *et al.*, 1999; Jedlitschky *et al.*, 1994). Hal kajian dari beberapa peneliti menunjukkan bahwa P-gp mampu berfungsi sebagai transporter untuk berbagai jenis senyawa antikanker seperti antrasiklin, vinka alkaloid, paclitaxel, sedangkan MRP1 memiliki kemampuan yang mirip tetapi tidak indentik terhadap seluruh substrat Pgp. (Campling *et al.* 1997; Legrand *et al.*, 1999). Mekanisme kerja dari P-gp dan MRP1 terlihat seperti pada Gambar 2.

04 KARATERISASI SENYAWA BIOAKTIF DARI BIOTA LAUT SEBAGAI MDR MODULATOR



Gambar 2 Mekanisme kerja Pgp dan MRP-1 pada sel tumor yang resistan

Berdasarkan topologinya, kedua jenis membran ini juga memiliki kemiripan seperti yang terlihat pada Gambar 3. P-gp dan MRP-1 masing – masing memiliki *membrane spanning domain* (MSD₁ and MSD₂) dan *nucleotide binding domains* (NBDS) (Kast & Gros, 1997). MRP1 dikarakteristikan dengan adanya tambahan *trans*-membrane unit (MSD₀) dan linker region (L₀). Lebih lanjut, *N*-terminus pada MRP1 terletak diluar membran sel (Zhang, 2000).



Gambar 3 Bentuk penyederhanaan topologi P-gp (A) dan MRP1 (B)

Berbagai jenis MDR-reversing agents terhadap P-gp seperti senyawa calcium channel blocker yaitu verapamil, inhibitor calmodulin dan cyclosporin A telah digunakan (Ford & Hait, 1990; Slater *et al.*, 1986). Tetapi senyawa-senyawa tersebut awalnya tidak

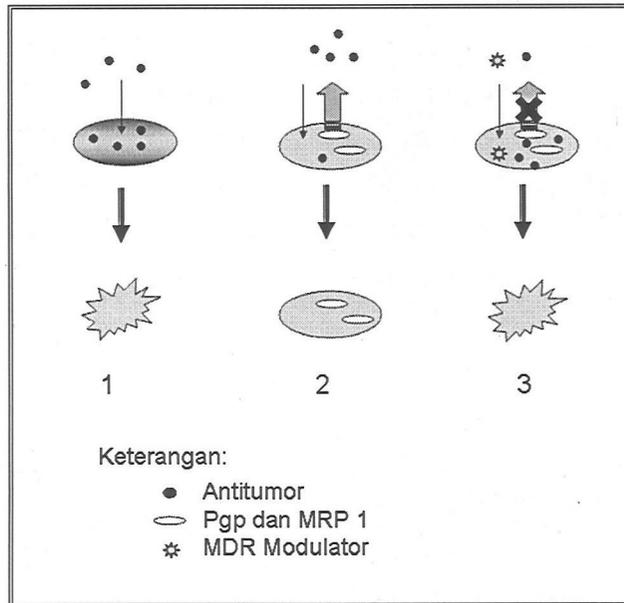
04 KARATERISASI SENYAWA BIOAKTIF DARI BIOTA LAUT SEBAGAI MDR MODULATOR

dikembangkan sebagai MDR modulator atau *reversing agent* dan dalam penggunaannya memiliki masalah efek samping. Sebagai contoh, cyclosporine A sesungguhnya dikembangkan untuk *immunosuppressing agent* dan verapamil sebagai calcium antagonist. Dilain pihak sedikit sekali MDR modulator atau *MDR-reversing agents* yang mampu menghambat MRP1. BSO, merupakan salah satu contoh *inhibitor glutathione synthases* yang mampu menghambat fungsi MRP1-mediated MDR (Zaman *et al.*, 1994; Griffith and Meister, 1979). Hasil penelitian akhir – akhir ini telah dikembangkan, pyridine analog PAK-104 yang memperlihatkan aktifitasnya terhadap MRP1-mediated MDR cells (Sumizawa *et al.*, 1997).

B. Mekanisme MDR Modulator

Upaya mendapatkan senyawa bioaktif yang memiliki sifat sebagai MDR modulator pada dasarnya harus mampu menghambat fungsi P-gp ataupun MRP1 yang mampu mengeluarkan senyawa antitumor dari dalam sel. Seperti pada Gambar 4 terlihat bahwa pada keadaan 1 sel tumor akan mengalami kematian bila diberi senyawa anti tumor. Namun adanya penampakan P-gp ataupun MRP1 (keadaan 2) sel tumor menjadi resisten terhadap berbagai jenis senyawa anti tumor dan akan cenderung tetap hidup karena akumulasi senyawa anti tumor dalam sel tumor MDR diminimalkan. Bila sel tumor yang telah resisten diberi perlakuan dengan menambahkan senyawa MDR modulator (keadaan 3) senyawa antitumor dapat kembali terakumulasi di dalam sel tumor dan menyebabkan kematian. Prinsip kerja ini telah dijadikan acuan untuk mendapatkan dan pengembangan bahan alam ataupun senyawa hasil sintesis yang memiliki sifat sebagai MDR modulator.

04 KARATERISASI SENYAWA BIOAKTIF DARI BIOTA LAUT SEBAGAI MDR MODULATOR



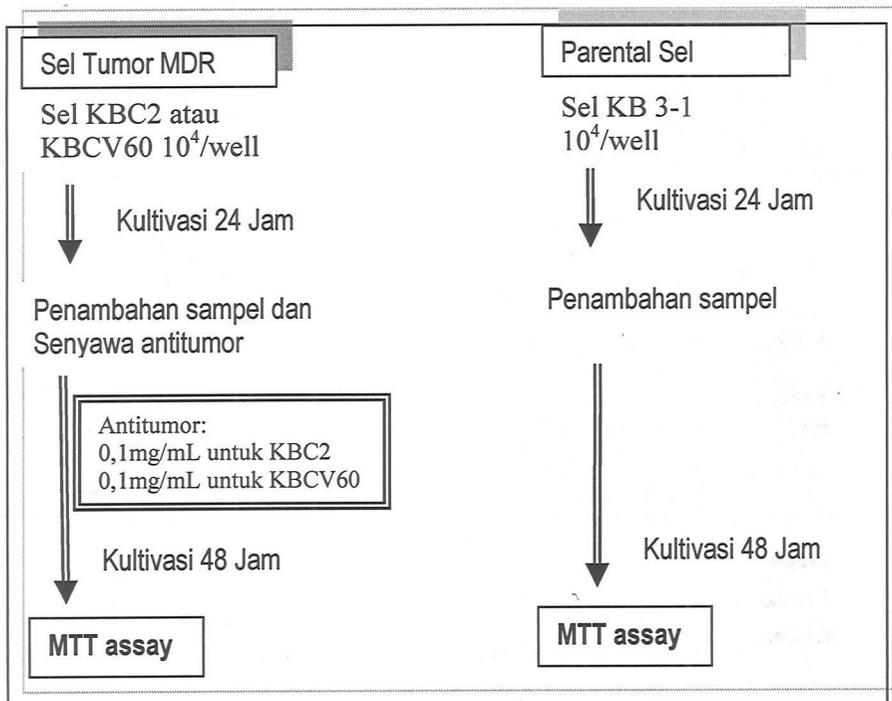
Gambar 4 Mekanisme umum peran MDR Modulator

C. Uji MDR Modulator

Persiapan sampel dapat dilakukan dengan cara mengekstrak mikroorganisme dengan pelarut diklorometan:metanol (95:5). Hasil ekstraksi selanjutnya perlu dipekatkan dengan rotari evaporator pada tekanan rendah. Hasil masing-masing ekstrak kemudian diuji terhadap sel tumor misalnya, KB31, KBC2 dan KBCV60, seperti terlihat pada Gambar 5. Untuk uji bioaktivitas sebagai antitumor dan *reversal agents* dilakukan secara *in vitro* dengan metoda MTT assay sebagai mana yang telah dilakukan oleh Aoki *et. al.* (2001). Secara sederhana 10.000 sel KB (*human epidermoic carcinoma cell line*) dalam 100 μ l medium Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (RPMI-1640 medium) yang mengandung suplemen 10 % fetal bovine serum yang telah diaktifkan dengan pemanasan, kanamycin (50 μ g/ml) dibiakkan dalam mikroplat datar dengan 96 lubang dan 100 μ l larutan bahan aktif dengan konsentrasi bervariasi dan pengujian dilakukan secara triplo. Plat diinkubasikan selama 3 hari pada 37 °C pada kondisi 5% CO₂. Pereaksi MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide dibuat dengan konsentrasi 2 mg/ml dalam Dulbecco's phosphate-buffered saline tanpa kalsium dan magnesium dan disimpan dalam refrigerator. Pada hari ke 3, pereaksi MTT (25 μ l)

04 KARATERISASI SENYAWA BIOAKTIF DARI BIOTA LAUT SEBAGAI MDR MODULATOR

ditambahkan ke dalam masing-masing lubang pada mikroplat. Setelah inkubasi selama 3jam pada 37 °C, mikroplat digoyang 10 menit dan medium dihilangkan dengan menggunakan aspirator. Untuk melarutkan kompleks MTT-formazan, 0,2 ml larutan dimethyl sulfoxide (DMSO) ditambahkan kedalam setiap lubang mikroplat dan diaduk dengan menggunakan pengaduk mekanik. Pengukuran absorbansi kompleks MTT yang terbentuk (OD_{540}) dilakukan pada 540 nm menggunakan *Micro Plate Reader*.



Gambar 5 Uji MDR Modulator terhadap sel tumor

Persentasi hambatan pertumbuhan sel dihitung berdasarkan persamaan berikut:

$$\% \text{ hambatan pertumbuhan sel} = (1 - T/C) \times 100$$

C adalah OD_{540} rata-rata dari kontrol

T adalah perlakuan sampel

Hambatan pertumbuhan sel pada tahap awal dilakukan dengan pengujian terhadap dua konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$ dan 10 $\mu\text{g/ml}$.

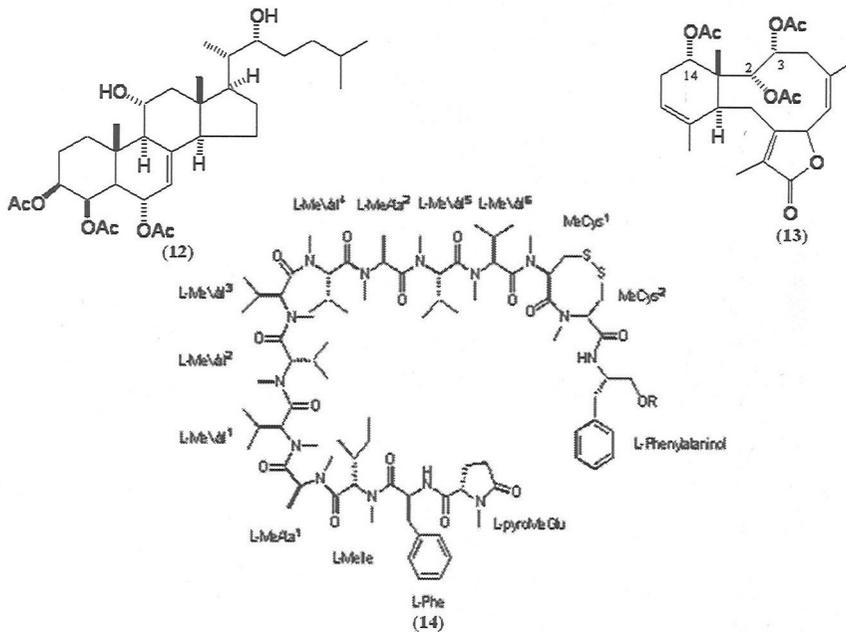
IV Keragaman Struktur MDR Modulator

Berbagai jenis MDR modulator yang memiliki akatifitas terhadap P-gp seperti senyawa verapamil, calmodulin inhibitor dan cyclosporin A telah digunakan (Slater *et al.*, 1986). Tetapi senyawa-senyawa tersebut awalnya tidak dikembangkan sebagai *reversing agent* dan dalam penggunaannya menimbulkan masalah efek samping. Sehingga upaya mendapatkan senyawa yang memiliki aktivitas sebagai MDR modulator masih terus dilakukan.

Evaluasi bioaktivitas dari senyawa yang berhasil dari biota laut seringkali menghadapi kendala karena setiap laboratorium yang ada mengembangkan metoda skrining dengan menggunakan sel ataupun standar anti tumor yang berbeda. Dalam pembahasan ini, senyawa-senyawa bahan alam laut seperti agosterol A, briantein A, dan kendarimide A diketahui memiliki aktifitas sebagai MDR modulator dalam sel karsinoma KB dan diuji dengan kondisi yang sama.

Hasil evaluasi uji MDR modulator terhadap senyawa agosterol A (**12**) menunjukkan bahwa senyawa ini dapat menghambat pertumbuhan sel KBC2 yang telah resisten terhadap colchicine dan sel KBCV60 yang telah resisten terhadap colchicine dan vincristine serta tidak menunjukkan sifat toksik terhadap parental sel, KB31 (Aoki *et al.*, 1998). Hasil analisis hubungan antara struktur **12** dengan aktivitasnya sebagai MDR modulator menunjukkan bahwa gugus asetil dan hidroksi pada struktur sangat penting (Aoki *et al.*, 1999; Setiawan, 2000). Berbeda dengan senyawa briantine A (**13**), senyawa ini hanya memperlihatkan aktivitas sebagai MDR modulator terhadap sel KBC2. Sedangkan untuk senyawa kendariaamide A (**14**), aktivitas yang ditunjukkan lebih spesifik sebagai MDR modulator pada sel KBCV60. (Kotoku *et al.*, 2005).

04 KARATERISASI SENYAWA BIOAKTIF DARI BIOTA LAUT SEBAGAI MDR MODULATOR



Berdasarkan informasi di atas dapat dilihat bahwa ada perbedaan mekanisme interaksi antara ketiga senyawa tersebut dengan protein target yang menyebabkan fungsi dari P-gp dan MRP1 dapat dihambat. Kajian lebih lanjut untuk mengetahui posisi ikatan senyawa 12 dengan P-gp dan MRP1 telah dilakukan dengan menggunakan senyawa bertanda yang menunjukkan bahwa L₀ region merupakan salah satu sisi yang vital dalam proses penghambatan fungsi P-gp dan MRP1. Namun untuk mekanisme interaksi antara senyawa 13 dan 14 terhadap protein target belum dilakukan.

V Kesimpulan

Berdasarkan uraian di atas dapat disimpulkan bahwa perairan Indonesia memiliki keragaman biota laut yang dapat dijadikan sebagai sumber potensial untuk senyawa bioaktif. Keragaman biota laut mencerminkan pula potensi keragaman struktur senyawa bioaktif yang dihasilkan. Hasil uraian di atas juga menunjukkan adanya variasi struktur senyawa bioaktif yang memiliki sifat sebagai MDR modulator. Lebih lanjut, keragaman struktur MDR modulator mempengaruhi sifat bioaktivitasnya. Hal ini juga menunjukkan bahwa adanya mekanisme penghambatan fungsi dari Pgp dan MRP1 yang berbeda-beda. Untuk kajian lebih lanjut mekanisme interaksi antara MDR modulator khususnya untuk senyawa kendarimide A dengan protein target masih belum diketahui. Sementara

04 KARATERISASI SENYAWA BIOAKTIF DARI BIOTA LAUT SEBAGAI MDR MODULATOR

interaksi agosterol A yang dapat hambatan fungsi MRP1 terjadi diketahui terjadi pada lingker region (Lo).

Daftar Pustaka

- Aoki, S., Kong, D., Suna, H., Sowa, Y., Sakai, T., Setiawan, A., Kobayashi, M. (2006), Aaptamine, a spongean alkaloid, activates p21 promoter in a p53-independent manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342 :101–106.
- Aoki, S., Kong, D., Matsui, K.; Kobayashi, M. (2004), Erythroid differentiation in K562 chronic myelogenous cells induced by crambescidin 800, a pentacyclic guanidine alkaloid. *Anticancer Res.* 24:2325-2330
- Aoki, S., Matsui, K., Tanaka, K., Satari, R., Kobayashi, M. (2000). Lembhehyne A, a Novel Neuritogenic Polyacetylene, from a Marine Sponge of *Haliclona* sp., *Tetrahedron* 56: 9945-9948.
- Aoki, S., Setiawan, A., Yoshioka, Y., Higuchi, K., Fudetani, R., Chen, Z-S., Sumizawa, T., Akiyama, S., Kobayashi, M. (1999), Reversal of Multidrug Resistance in Human Carcinoma Cell Line by Agosterols, Marine Spongean Sterols. *Tetrahedron* 55:13965-13972.
- Aoki, S., Watanabe, Y., Sanagawa, M., Setiawan, A., Naoyuki Kotoku, N., Kobayashi, M., (2006) Cortistatins A, B, C, and D, Anti-angiogenic Steroidal Alkaloids, from the Marine Sponge *Corticium simplex*". *J. Am. Chem. Soc.*, 128:3148 -3149.
- Aoki, S., Yoshioka, Y., Miyamoto, Y., Higuchi, K., Setiawan, A., Murakami, N., Chen Z-S., Sumizawa, T., Akiyama, S., Kobayashi, M. (1998), Agosterol A, a Novel Polyhydroxylated Sterol Acetate Reversing Multidrug Resistance from a Marine Sponge of *Spongia* sp. *Tetrahedron Letters* 39:6303-5306.
- Aoki, S., Z.S. Chen, Higashiyama, K., Setiawan, A. Akiyama, S., Kobayashi, M. (2001), Reversing effect of agosterol A, a spongean sterol acetate, on multidrug resistance in human carcinoma cells. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92: 886-895.
- Campling B.G., Young, L.C., Baer, K.A., Lam, Y.M., Deeley, R.G., Cple, S.P.C., Gerlach J.H.. (1997) Expression of MRP and MDR1 multidrug resistance gene in small lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 3: 115-122.
- Cole, S.P.C., Bhadrwaj, G., Gerlarch, J.H., Mackie, J.E., Grant, C.E., Almquist, K.C., Stewart, A.J., Kurx, E.U., Duncan, A.M., Deeley, R.G. (1992) Overexpression of transporter gene in multidrug-resistant human lung cancer cell lin. *Science*, 258: 1650-1654.
- Endicott, J.,A., Ling, V. (1989), The biochemistry of P-glycoprotein-incicated multidrug resistance. *Annu. Rev. Biochem.*, 54:137-171.
- Faulkner, D., J. (2001), Marine Natural Products. *Nat. Prod. Rep.*, 18:1-49
- Ford, J.,M., Hait, W.N. (1990), Pharmacology of drug that alter multidrug resistance. *Pharmacol. Rev.*, 42:155-159.
- Griffith, O., W. and Meister, A. (1979) Potent and specific inhibitor of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-buthyl homocysteine sulfoximine). *J. Biol. Chem.*, 254: 7558-7560.
- Hanif, N., Tanaka, J., Setiawan, A., Trianto, A., de Voogd, N., J., Murni, A., Tanaka, C., Higa, T.(2007), Polybrominated Diphenyl Ethers from the Indonesian Sponge *Lamellodysidea herbacea*. *J. Nat. Prod.*, 70: 432 -435.

04 KARATERISASI SENYAWA BIOAKTIF DARI BIOTA LAUT SEBAGAI MDR MODULATOR

- Issa, H.,H., Tanaka,J. Rachmat, R., Setiawan,A., Trianto A., Higa, T. (2005) Polycitorols A and B, New Tricyclic Alkaloids from an Ascidian" *Mar. Drugs*, 3: 78-83.
- Jedlitschky, G., Leiser, I., Buchholz, U., Center, M., Keppler, D. (1994) ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance-associated protein *Cancer Res.*, 54: 4833-4836.
- Joffe, S., Thomas, R. (1989) Phytochemicals: a renewable global resource. *Biotech News Information.*, 1: 697-700.
- Kast, C & Gross, P. (1997) topology mapping of the amino-terminal half of multidrug resistance-associated protein by epitope insertion and immunofluorescence. *J. Bio. Chem.*, 272: 26479-26487.
- Kotoku, N., Liwei Cao, Shunji Aoki, Motomosa Kobayashi, (2005), Absolute Stereo-structure of Kendarimide A, a Novel MDR Modulator, from a Marine Sponge". *Heterocyc.* 65: 563-578.
- Legrand, O., Simonin, G., Beauchamp-Nicound, A., Zittoun, R., Marie, J.P. (1999), Tolyporpin, a novel multidrug resistance reversing agent from blue-green alga *Tolypothris nodosa*. *J. Am. Chem. Soc.*, 114: 385:387.
- Rappa, G., Finch, R.A., Sartocelli, A.C., Lorico, A. (1999), New insight into biology and pharmacology of multidrug resistance protein (MRP) from gene knock-out model. *Biochem. Pharmacol.*, 58: 557 – 562.
- Setiawan, A. (2000), Pembuatan Turunan Agosterol A Sebagai Substrat Membran Protein P-gp. *J. Sains Tek*, 6: 86-91.
- Setiawan, A. (2004), Bioaktivitas 9-Demetoksiaaptamin dari Ekstrak *Sponge Aaptos* sp. Terhadap Sel Karsinoma KB31, KBC2, dan KBCV60". *J. Sains Tek.*,10:1-6.
- Slater, L.M., Sweet, P., Stupecky, M., Gupta, S. (1996), Cyclosporin A reverses vincristine and dounorubicin resistance in acute lymphatic leukemia in vitro. *J. Clin. Invest.*, 77: 1405-1408.
- Sumizawa, T., Chen, Z-S., Chuman, Y., Seto, K., Furukawa, T., Haraguchi, M., Tani, A., Shudo, N., Akiyama, S. (1997), Reversal of multidrug resistance-associated protein-mediated drug resistance by pyridine analog PAK-104P. *Mol. Pharmacol.*, 51: 399-405.
- Zaman, G. J. R., Flents, M. J., van Leuschen, M., R., de Haas, M., Mulder, H. S., Lankelman, J., Pinedo, H.M., Scheper, R. J., Baas, F., Broxterman., H.J., Borst, P., (1994), The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membran drug-efflux pump. *Proc. Natl. Acad Sci. U.S.A.*, 91: 8822-8826.
- Zang, J-T. (2000), Determination of extracellular location of N-terminus of human multidrug resistance-associated protein. *J. Biochem.*, 348:597-606.

INDEKS

-Amilase	83	G	
Aktivitas Biologis	261	Glukosa	295
Aktivitas protease	220	<i>Glycosylated hemoglobin</i>	296
Aldimin	297	H	
Analisis senyawa Kitin	184	<i>Heat flux</i> DSC	116
Artocarpus	1	HPSEC	150
Artoindonesianin D (2)	3	I	
Artoindonesianin L (4)	8	Inhibitor	227
Artonin E (1)	2	Isolasi Kitin	285
Artonin M (5)	12	Isolat Lokal	83
Arylamine <i>N</i> -acetyltrasferase	310	K	
Asam laktat	188	Karakterisasi Enzim	91
B		Karakterisasi protease	222
<i>Bacillus cereus</i>	304	Katalis biologi	171
<i>Bacillus subtilis</i> ITBCCB148	83	Kitin	179, 280
Biodisel	164	Ketoamin	297
Biomassa alga	244	kitosan	280
Bioremediasi	303	Konversi bioteknologi	188
Biota Laut	48	L	
2,2'-Bipirimidin	230	Laktonitril	189
D		Lipase	199
DBPs	152	M	
Degradasi Kitosan	286	MDR Modulator	48
Deproteinasi Secara Kimiawi	183	Mekanisme katalitik	
Deproteinasi secara termal	182	Enzim lipase	205
Dibutiltimah(IV) karboksilat	100	Mekanisme MRP-1	57
Difeniltimah(IV) karboksilat	100	Mekanisme Pgp	56
<i>Differential Scanning</i>		Mekanisme reaksi	26
<i>Calorimetry</i>	113	Membran penukar proton	131
Digital Polar 3.3	28	Metabolit Sekunder	255
Dipterocarpaceae	255	Metil ester	164
Disianamida	230	Metode Degradasi	70
E		Metode Hitungan Cawan	
Esterifikasi biomassa alga	246	Mikroskopik Langsung	291
Esterifikasi dua tahapan	167	Metode Hitungan Cawan	291
F		Metode <i>non-degradatif</i>	16
Fenilendiamin	305	Metode <i>non-degradatif</i>	16
Fraksinasi Senyawa Humat	65	Metode Pirolisis	72

<i>Minimum inhibition concentration</i>	101	Senyawa Humat	15, 64
Modifikasi biomassa alga	245	Senyawa humat larut air	150
Modifikasi Kimia	84	Sifat fisikokimia	206
<i>Most Propable Number (MPN)</i>	291	Sikloartobilosanton	6
Muatan Permukaan	244	Sintesis	100
N		Sintesis Senyawa Kompleks	231
N-Asetilglukosamin (GlcNAc)	284	Struktur Kristal Senyawa Kompleks	233
P		Suhu transisi kaca	117
Pendekatan Etnobotani	258	Sumber terbaharukan	188
Pendekatan Filogenetik	259	T	
Penentuan bobot molekul	153	Teknik Radiasi Grafting	131
<i>Power-compensation</i> DSC	116	Teknologi produksi	192
Proses Demineralisasi	183	Titik leleh	119
Proses Ekstraksi	181	Transesterifikasi	170
Protease	216	U	
R		Uji Aktifitas Anti Bakteri	289
Rantai oksidasi terminal	298	Kitosan	290
Reaksi enzim lipase	201	Uji antifungi	100
S		V	
<i>Sargassum sp</i>	243	Voltamogram siklik	26
Sel bahan bakar	131	Z	
Senyawa bioaktif	48	Zat pengalkil antikanker	26
Senyawa flavonoid	1		