

Senyawa Daun Rasamala (*Altingia excelsa* Nornha) sebagai Penghambat Proliferasi Sel Kanker Lidah Manusia *In Vitro*

Rasamala Leaves Compound (*Altingia excelsa* Nornha) as an Inhibitor of Human Tongue Cancer Cell Proliferation *In Vitro*

Risyandi Anwar,^{1*} Arlette Setiawan,² Supriatno³, Unang Supratman⁴

¹ Bagian Ilmu Kedokteran Gigi Anak, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Muhammadiyah Semarang

² Bagian Ilmu Kedokteran Gigi Anak, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Padjadjaran

³ Bagian Penyakit Mulut, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gajah Mada

⁴ Jurusan Kimia, Fakultas matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran

Abstrak

Kanker lidah merupakan penyakit ganas yang umum terjadi di rongga mulut dan hingga saat ini secara medis berhasil menyembuhkan sehingga sering dirawat kehidupan. Tujuan penelitian adalah untuk mengidentifikasi matabolitas sekunder daun Rasamala, menguji senyawa daun Rasamala terhadap penghambatan pertumbuhan sel SP-C1. Desain laboratorium eksperimental yang benar menggunakan garis sel kanker lidah mulut SP-C1 digunakan. Ekstrak etil asetat dipisahkan metabolit sekundernya dengan berbagai teknik kromatografi berpedoman pada aktivitas antiproliferasi untuk menghasilkan lima senyawa, yaitu asam 3,4-dihidroksi benzoat (1), asam galat (2), dan apigenin (3). Senyawa 1-3 diuji aktivitas antiproliferatifnya terhadap sel kanker lidah SP-C1 dan menunjukkan nilai IC₅₀ masing-masing 100, 100, dan 100 µg / mL. Analisis data menggunakan uji ANACOVA, Tukey HSD dengan taraf signifikansi $\alpha = 0,05$. Kesimpulannya, senyawa dari daun rasamala memiliki aktivitas antikanker yang kuat pada kanker mulut manusia SP-C1 melalui penghambatan proliferasi sel.

Kata kunci : *Altingia excelsa*, anti proliferasi, apigenin, asam benzoat 3,4-dihidroksi, asam galat, kanker mulut manusia SP-C1,

Abstract

Tongue cancer is a common malignant in the oral cavity and to now medically success its no good so often treated of life. The aims of study were to identify the secondary metabolites of Rasamala leaves, to examine the compound of Rasamala leaves toward SP-C1 cell growth inhibition. True experimental laboratories design using SP-C1 oral tongue cancer cell line was used. The ethyl acetate extract was separated their secondary metabolites by various chromatographic techniques guided by antiproliferative activity to yield five compounds, as 3,4-dihydroxy benzoic acid (1), gallic acid (2), and apigenin (3). Compounds 1-3 were tested on their antiproliferative activity against cancer cells tongue SP-C1 and showed IC₅₀ values of 100, 100, and 100 µg/mL, respectively. Data analysis using ANACOVA assay, Tukey HSD with the level of significance $\alpha=0.05$. In conclusion, compound from Rasamala leaves have a strong anticancer activity in human oral tongue cancer SP-C1 through inhibit cell proliferation.

Keywords : 3,4-dihydroxy benzoic acid, apigenin, gallic acid, human oral tongue cancer SP-C1, *Altingia excelsa*, anti-proliferative

Korespondensi (Correspondence) : Risyandi Anwar. Bagian Ilmu Kedokteran Gigi Anak, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Muhammadiyah Semarang, Jalan Kedungmundu Raya no.22 Semarang Email:

Kanker merupakan penyebab kematian nomor dua dunia setelah penyakit kardiovaskular, dengan persentase 12%.¹ Angka kejadian kanker pada rongga mulut di dunia berkisar antara 3-5 %, dan lebih dari 90% kanker rongga mulut merupakan karsinoma sel skuamosa (*Oral Squamous Cell Carcinoma/O SCC*) dan merupakan keganasan yang paling banyak terjadi di rongga mulut.^{2,3} Beberapa lokasi yang dapat terkena kanker pada rongga mulut antara lain bibir, mukosa bukal, daerah alveolar atas dan bawah, trigonum retromolar, palatum keras, dasar mulut dan dua pertiga anterior lidah.⁴ Perawatan karsinoma sel skuamosa rongga mulut saat ini terutama dilakukan dengan pembedahan, radioterapi, kemoterapi dan kombinasi.^{5,6} Kegagalan yang sering terjadi dalam usaha pengobatan kanker, utamanya melalui kemoterapi, lebih disebabkan rendahnya selektivitas obat-obat

anti kanker dan sensitivitas sel kanker itu sendiri terhadap agen kemoterapi.⁵ Pendekatan terapi kanker dapat dilakukan dengan menghambat perkembangan sel kanker tersebut salah satunya dengan cara penghambatan proliferasi yang dapat teramati secara *in vitro*.⁷ Usaha penemuan obat baru yang aman dan selektif terhadap pengobatan dan pencegahan kanker dengan mengetahui pengaruh molekuler terhadap sel kanker perlu dilakukan, salah satunya dengan cara pencarian senyawa kimia dari alami dengan memanfaatkan kekayaan alam.⁸

Sejak zaman prasejarah manusia telah memanfaatkan ekstrak tanaman untuk pengobatan berbagai penyakit. Sebanyak 60% populasi penduduk dunia bergantung pada pengobatan tradisional dan 80% nya berada di negara berkembang.⁹ Obat herbal sangat berperan secara signifikan terhadap

pengembangan obat sintesis, sebanyak 60% obat antikanker dan 75% obat penyakit infeksi yang dikeluarkan tahun 1981-2002 dapat dirunut ke bahan alam.⁹ *National cancer institute* (NCI) Amerika Serikat juga mengembangkan penelitian tentang penggunaan bahan alam untuk terapi kanker karena banyak ditemukan obat antikanker yang berasal dari berbagai tanaman.¹⁰ Salah satu famili dalam tumbuhan yang banyak diteliti untuk pengobatan antikanker adalah Hamamelidaceae. Beberapa tumbuhan dari famili Hamamelidaceae yang pernah diteliti sebagai antikanker di antaranya adalah *Liquidambar styraciflua*.¹¹⁻¹³ Tumbuhan lain dari famili hamamelidaceae yang pernah diteliti untuk antikanker adalah *L. Formosana* dan *corylopsis coreana* Uyeki.¹⁴⁻¹⁷

Salah satu tumbuhan yang termasuk famili Hamamelidaceae dan genus *Altingia* dan hanya tumbuh di daratan Asia serta banyak tersebar di Jawa Barat adalah Rasamala (*Altingia excelsa* Nomha) yang hidup di daerah tropis dan dataran tinggi, terutama di daerah pegunungan Jawa Barat.¹⁸ Penelitian terhadap daun Rasamala yang berasal dari daerah Arunachal Prades India, dan mendapatkan minyak atsiri yaitu monoterpen sebagai komponen utama dan seskuiterpen sebagai komponen minor pernah dilakukan.¹⁹ Tumbuhan yang memiliki hubungan taksonomi yang dekat, seperti satu famili atau satu genus akan memiliki aktivitas yang hampir sama.²⁰ Rasamala (*Altingia excelsa* Nomha) diharapkan memiliki kandungan senyawa kimia yang mempunyai aktivitas sebagai antikanker.

METODE PENELITIAN

Spektra Ultra-violet diukur dalam methanol pada spektrofotometer jasco UV-1575. Spektra IR diukur pada Perkin Elmer spectrum-100 dalam KBr. Spektra NMR diukur dalam JEOL JNM A-500 spectrometer menggunakan tetra methyl silane (TMS) sebagai standar. Pemisahan dilakukan dengan berbagai teknik kromatografi dengan silica gel 60 (Merck). Plat TLC silica gel GF254 (Merck, 0.25mm) dan dideteksi dengan 10% H₂SO₄ dalam etanol, dilanjutkan dengan pemanasan. Sedangkan untuk uji proliferasi sel kanker SP-C1 alat dan bahan yang digunakan adalah DMEM, DMSO, trypsin-EDTA, ELISA microplate reader (BioRed-Jepang), plate 96 sumuran (Iwaki-Jepang), labu takar 15 mL dan 50 mL (Eppendoff-Jerman), waterbath (Eyele-Jepang), multi-channel micropipet (Effendorf-Jerman), inkubator 37°C-CO₂ 5% (Sanyo-Jepang), neraca digital elektronik (Mettler -Swiss), Laminar Flow (Sanyo-Jepang), lampu spiritus, mikroskop (Nikon Eclipse-Jepang), Kamera (Sony-Jepang).

Sampel yang digunakan adalah daun rasamala yang diperoleh dari pegunungan Wayang Windu, Pangalengan, Bandung dan dideterminasi di Laboratorium Taksonomi

Tumbuhan, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran. Subjek penelitian ini adalah sel kanker lidah manusia *Supri's Clone 1* (SP-C1). SP-C1 merupakan sel kanker lidah yang diisolasi dari limfonodi penderita kanker lidah, berasal dari karsinoma sel skuamosa sedang dan belum mengalami invasi ke jaringan otot.²¹

Ekstraksi daun Rasamala

Daun kering Rasamala (2,5 kg) dimaserasi dengan metanol pada suhu kamar selama 24 jam dan dilakukan penampungan maserat sebanyak tiga kali. Maserat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* sampai diperoleh maserat pekat metanol. Maserat pekat metanol dilarutkan dalam air, kemudian dipartisi dengan *n*-heksana dan dihasilkan ekstrak *n*-heksana dan air. Ekstrak *n*-heksana dipisahkan dan dipekatkan dengan *rotary evaporator*, dihasilkan ekstrak pekat *n*-heksana. Lapisan air yang diperoleh kemudian dipartisi dengan etil asetat dihasilkan ekstrak etil asetat dan air. Ekstrak etil asetat dipisahkan dan dipekatkan dengan *rotary evaporator*, dihasilkan ekstrak pekat etil asetat (120 g). Masing-masing ekstrak dilakukan uji antiproliferasi terhadap sel kanker lidah SP-C1 untuk diketahui ekstrak mana yang paling aktif sebagai antikanker yang selanjutnya ekstrak tersebut akan di isolasi.

Isolasi ekstrak Etil Asetat sebagai ekstrak teraktif

Ekstrak etil asetat (120 g) dipisahkan dengan kromatografi cair vakum (KCV) pada fasa diam silika gel *G₆₀* dengan fasa gerak *n*-heksana-etil asetat -metanol dengan gradien 10% (v/v), setelah digabungkan berdasarkan analisis kromatografi lapis tipis (KLT) diperoleh lima fraksi utama (A-E), dan kemudian dilakukan uji aktivitas antiproliferasi ke lima fraksi tersebut. Berdasarkan nilai IC₅₀ berbagai fraksi hasil uji antiproliferasi tersebut, yang mempunyai potensi sebagai antiproliferasi adalah Fraksi C. Fraksi C (26 g) dipisahkan lebih lanjut dengan kromatografi cair vakum (KCV) pada fasa diam silika gel *G₆₀* dengan fasa gerak *n*-heksana-etil asetat-metanol dengan gradien 10% (v/v), setelah digabungkan berdasarkan analisis kromatografi lapis tipis (KLT) diperoleh lima fraksi (C₁-C₅), dan kemudian dilakukan uji aktivitas antiproliferasi ke lima fraksi tersebut. Berdasarkan nilai IC₅₀ hasil uji antiproliferasi di atas, menunjukkan bahwa Fraksi C₃ dan C₅ memberikan aktivitas potensi sebagai antikanker. Fraksi C₃ (6 g) dipisahkan lebih lanjut dengan kromatografi kolom (KK) pada fasa diam silika gel (70-230 mesh) dengan fasa gerak *n*-heksana:etil asetat bergradien 10% (v/v) sehingga diperoleh empat fraksi utama (C₃₁-C₃₄) setelah digabungkan berdasarkan analisis KLT, dan dilakukan uji aktivitas antiproliferasi keempat fraksi tersebut. Berdasarkan nilai IC₅₀ uji antiproliferasi, terlihat

bahwa fraksi C₃₂ mempunyai potensi sebagai antiproliferasi. Fraksi C₃₂ (2 g) dipisahkan lebih lanjut dengan kromatografi kolom (KK) pada fasa diam silika gel (70-230 mesh) dengan fasa gerak *n*-heksan:aseton sehingga diperoleh empat fraksi C₃₂₁-C₃₂₄. Fraksi C₃₂₁ dihasilkan padatan amorf dan direkristalisasi lebih lanjut dengan campuran *n*-heksan:metanol (4:1), diperoleh senyawa **1** berbentuk kristal putih (7 mg).

Fraksi C₅ (6 g) dipisahkan lebih lanjut dengan kromatografi kolom (KK) pada fasa diam silika gel (70-230 mesh) dengan fasa gerak *n*-heksan-etil asetat bergradien 5% sehingga diperoleh lima fraksi utama C₅₁-C₅₅. Pada C₅₁ dihasilkan padatan amorf dan direkristalisasi lebih lanjut dengan campuran *n*-heksan:metanol (4:1), diperoleh senyawa **2** berbentuk kristal putih (8 mg), dan kemudian dilakukan uji aktivitas antiproliferasi ke tiga fraksi yang tersisa yaitu C₅₂, C₅₃ dan C₅₄. Berdasarkan persentase kematian sel dan nilai IC₅₀ uji antiproliferasi tersebut diatas, fraksi C₅₃ mempunyai potensi sebagai antiproliferasi. Fraksi C₅₃ dipisahkan lebih lanjut dengan kromatografi kolom (KK) pada fasa diam silika gel (70-230 mesh) dengan fasa gerak *n*-heksana:aseton (7:3) dihasilkan padatan amorf dan direkristalisasi lebih lanjut dengan campuran *n*-heksan:metanol (4:1), diperoleh senyawa **3** berbentuk kristal putih (13 mg).

Penentuan struktur senyawa 1-3

Senyawa hasil isolasi ditetapkan sifat fisiknya meliputi warna dan titik lelehnya. Struktur kimia senyawa ditentukan berdasarkan data-data spektroskopi meliputi Ultra-Violet (UV), inframerah (IR), resonansi magnetik inti proton (¹H-NMR), karbon (¹³C-NMR), *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer* (DEPT), dan massa, serta perbandingan dengan data spektra yang diperoleh dari literatur.²²

Biakan Sel Kanker Lidah SP-C1

Jaringan sel kanker lidah SP-C1 dimasukkan ke dalam Flash (Falcon, USA) berisi DMEM yang ditambah Fetal Bovine Serum 10 % (FBS, morregate, BioTech, Australia), Fungizone liquid 5 ml (Gibco, USA). Sel kanker diinkubasi dengan kelembaban udara 95 % dan CO₂ 5 % pada suhu 37°C. Dibiakan dalam flash dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setiap 4-5 hari medium DMEM harus diganti dengan medium yang baru, sampai jumlah sel kanker dapat dipanen. Setelah jumlah sel telah memenuhi flash (dapat dilihat di bawah mikroskop), medium diaspirasi, kemudian dicuci dengan PBS steril 5 ml selama 1 menit, kemudian diaspirasi lagi. Dimasukkan larutan trypsin-EDTA 0,25% 1 ml pada masing-masing petridish, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Sel diberi RPMI untuk menghentikan EDTA. Semua sel dipanen dan dimasukkan dalam conical tube 20 ml. Sel di ambil menggunakan pipet dan dimasukan ke

dalam haemocytometer untuk menghitung banyaknya sel per plate

Uji antiproliferasi sel MTT Assay

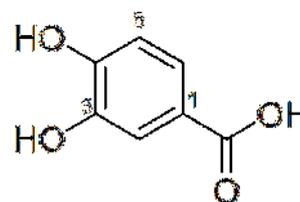
Disiapkan 5 buah *plate* yang berisi 96 sumuran, untuk pengujian MTT Assay jam ke 24. Kemudian pada masing-masing *plate* masukkan sel kanker lidah SP-C1 sebanyak 1 X 10⁴ sel/sumuran di tambahkan 100 µL DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) sesuai dengan konsentrasi senyawa. Semua sel kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam setiap 96 well *plate* di tambahkan MTT sebanyak 15 µL per sumuran. Medium diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam. Larutan dibuang, kemudian masukkan larutan isopropanol 100µl. Shaker 10-15 menit sampai homogen. *Plate* 96 sumuran diukur dengan Bio-Rad Microplate Reader dengan panjang gelombang 540 nm.

HASIL

Hasil uji antiproliferasi ekstrak menunjukkan ekstrak etil asetat merupakan ekstrak teraktif (Tabel 1), sehingga ekstrak etil asetat dilanjutkan untuk diisolasi. Hasil perbandingan senyawa 1 dan 2 menunjukkan bahwa kedua senyawa memiliki kesesuaian yang sangat tinggi, dengan demikian dapat disimpulkan bahwa senyawa 1 adalah asam 3,4-dihidroksi benzoat seperti yang ditunjukkan pada gambar 1 dan tabel 2. Sedangkan, hasil perbandingan senyawa 3 menunjukkan bahwa kedua senyawa memiliki kesesuaian yang sangat tinggi (Tabel 4), sehingga senyawa 3 diidentifikasi sebagai apigenin (Gambar 3).

Tabel 1. Nilai IC₅₀ berbagai ekstrak daun Rasamala.

Ekstrak	IC ₅₀ (µg/mL)
Methanol	75,41
<i>n</i> -heksan	44,85
etil asetat	12,85
Air	18,02



Gambar 1. asam 3,4-dihidroksi benzoat

Tabel 2. Perbandingan data NMR senyawa 1 dengan asam 3,4-dihidroksi benzoat (Gurial *et al.*, 2013)

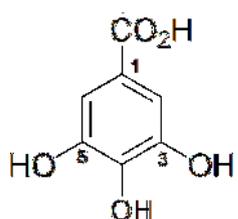
Posisi C	Senyawa 1 (aseton- d_6)		asam 3,4-dihidroksi benzoat (DMSO- d_6)	
	δ_c (ppm)	δ_H (ppm), ΣH , mult, J (Hz)	δ_c (ppm)	δ_H (ppm), ΣH , mult, J (Hz)
1	123,1	-	122,0	-
2	117,5	7,46 (2H, d, 1,9; 8,4)	116,9	7,31 (2H, d, 2,1; 8,1)
3	145,6	-	145,2	-
4	150,7	-	150,3	-
5	115,7	6,88 (1H, d, 8,4)	115,5	6,80 (1H, d, 8,1)
6	123,7	7,50 (1H, d, 1,9)	122,3	7,36 (1H, d, 2,1)
CO ₂ H	167,6	-	167,7	-

Tabel 3. Perbandingan data NMR senyawa 2 dengan asam galat (Gangadhar *et al.*, 2011)

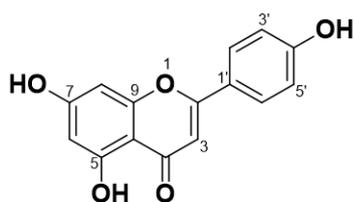
Posisi C	Senyawa 2 (aseton- d_6)		Asam galat (CD ₃ OD)	
	δ_c (ppm)	δ_H (ppm), ΣH , mult, J (Hz)	δ_c (ppm)	δ_H (ppm), ΣH , mult, J (Hz)
1	122,2	-	120,6	-
2	110,7	7,15 (1H, s)	108,9	7,07 (1H, s)
3	145,9	-	144,9	-
4	138,6	-	138,2	-
5	145,9	-	144,9	-
6	110,7	7,15 (1H, s)	108,9	7,07 (1H, s)
CO ₂ H	167,7	-	169,0	-

Tabel 4. Perbandingan data spektroskopi NMR senyawa 3 dengan apigenin (Ogihara, 2011)

Posisi C	Senyawa 3 (aseton- d_6)		apigenin (CD ₃ OD)	
	δ_H (ppm), ΣH , mult, J (Hz)	δ_c (ppm)	δ_H (ppm), ΣH , mult, J (Hz)	δ_c (ppm)
2	-	165,9	-	164,4
3	6,51 (1H, s)	103,4	6,58 (1H, s)	104,2
4	-	183,5	-	182,4
5	6,34 (1H, d, 1,9)	163,2	6,83 (1H, d, 2,1)	163,9
6	-	101,5	-	100,8
7	6,11 (1H, d, 1,9)	167,3	6,71 (1H, d, 2,1)	165,2
8	-	96,1	-	97,3
9	-	159,8	-	160,7
10	-	105,0	-	105,1
1'	-	123,2	-	123,1
2', 6'	7,83 (2H, d, 9,1)	129,4	7,83 (1H, d, 8,8)	129,3
3', 5'	6,91 (1H, d, 9,1)	117,3	6,92 (1H, d, 8,8)	117,6
4'	-	163,1	-	162,6



Gambar 2. Struktur asam galat.



Gambar 3. Struktur apigenin

Tabel 5. Nilai IC₅₀ Senyawa 1-3 terhadap sel kanker lidah SP-C1

Senyawa	IC ₅₀ (μg/mL)
1	23,45
2	17,92
3	12,96

PEMBAHASAN

Dengan dipandu dengan uji antiproliferasi, terhadap ekstrak etil asetat dilakukan metode pemisahan dan pemurnian hingga diperoleh tiga senyawa.

Senyawa 1

Senyawa 1 diperoleh sebagai padatan putih, titik leleh 249-251 °C, UV (MeOH) λ_{maks} nm 292 (log ϵ 2,4), 323 (log ϵ 2,7) dan 364 (log ϵ 3,7); IR (KBr) ν_{maks} cm⁻¹: 3420, 1648, 1437, 1019; ¹H-NMR (aseton- d_6 , 500 MHz) δ_H (ppm) 7,46 (1H, dd, J=1,9; 8,4 Hz, H-6), 6,88 (1H, d, J=8,4 Hz, H-5), 7,55 (1H, d, J=1,9 Hz, H-2), ¹³C-NMR (aseton- d_6 , 125 MHz) δ_c (ppm): 123,1 (C-1),

117,5 (C-2), 145,6 (C-3), 150,7 (C-4), 115,7 (C-5), dan 123,7 (C-6).

Struktur kimia Senyawa 1

Senyawa 1 diperoleh berupa padatan putih dengan titik leleh 249-251 °C. Spektrum UV senyawa 1 menunjukkan adanya tiga pita serapan pada λ_{maks} 292, 323 dan 364 nm. Spektrum IR (Gambar 4.5) menunjukkan adanya vibrasi pada ν_{maks} 3420 cm^{-1} dengan puncak yang lebar dan tajam yang diduga berasal dari gugus -OH yang membentuk ikatan hidrogen. Keberadaan gugus -OH ini diperkuat pula dengan munculnya regang C-O pada ν_{maks} 1020 cm^{-1} . Spektrum 1H NMR senyawa 1, menunjukkan kehadiran tiga sinyal proton dengan sistem ABX yang beresonansi pada δ_H 7,50 ppm (1H, d, J = 1,9 Hz, H-2), 7,46 ppm (1H, dd, J = 1,9 dan 8,4 Hz, H-6) dan 6,88 ppm (1H, d, J = 8,4 Hz, H-5). Multiplisitas dari sinyal tersebut merupakan ciri adanya sistem ABX dari senyawa aromatik. Spektrum ^{13}C -NMR menunjukkan adanya tujuh sinyal karbon yang terdiri atas satu karbon karbonil yang beresonansi pada δ_C 167,6 ppm dan sinyal CH sp^2 yang beresonansi pada δ_C 150,7-115,7 ppm. Berdasarkan spektrum DEPT 135 diketahui bahwa terdapat tiga metin sp^2 dan empat karbon kuartener sp^2 . Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa senyawa 1 adalah asam 3,4-dihidroksi benzoat. Data NMR senyawa 1 dibandingkan dengan senyawa asam 3,4-dihidroksi benzoat.²³ Hasil perbandingan menunjukkan bahwa kedua senyawa memiliki kesesuaian yang sangat tinggi, dengan demikian dapat disimpulkan bahwa senyawa 1 adalah asam 3,4-dihidroksi benzoat seperti yang ditunjukkan pada gambar 1 dan tabel 2.

Senyawa 2

Senyawa 2 diperoleh berupa Padatan putih, t.l. 258-260 °C, UV (MeOH) λ_{maks} nm 222 (log ϵ 3,7), 271 (log ϵ 3,0) dan 404 (log ϵ 1,6); IR (KBr) ν_{maks} cm^{-1} : 3422, 1649, 1408, 1020; 1H -NMR (aseton- d_6 , 500 MHz) δ_H (ppm): 7,15 (2H, s, H-2, H-6); ^{13}C -NMR (aseton- d_6 , 125 MHz) δ_C (ppm): 122,2 (C-1), 110,7 (C-2, C-6), 145,9 (C-3, C-5), 138,6 (C-4), dan 167,7 (C-7).

Struktur Kimia Senyawa 2

Senyawa 2 diperoleh berupa padatan putih dengan titik leleh 258-260°C. Spektrum UV menunjukkan adanya dua pita serapan pada λ_{maks} 271 dan 222 nm. Spektrum IR menunjukkan adanya gugus -OH yang teramati pada ν_{maks} 3422 cm^{-1} dan regang C-O pada ν_{maks} 1021 cm^{-1} . Spektrum 1H NMR senyawa 2 menunjukkan kehadiran satu sinyal proton singlet yang beresonansi pada δ_H 7,14 ppm. Dua sinyal karbon masing-masing mewakili dua buah karbon, dengan demikian senyawa 2 ini memiliki struktur simetris. Spektrum ^{13}C NMR menunjukkan kehadiran tujuh sinyal karbon yang terdiri atas satu karbon karbonil yang beresonansi pada δ_C 167,6 ppm dan sinyal CH sp^2 yang beresonansi pada δ_C 145,9-110,1 ppm. Data

NMR senyawa 2 dibandingkan dengan senyawa asam galat.²⁴ Hasil perbandingan menunjukkan bahwa kedua senyawa memiliki kesesuaian yang sangat tinggi (Tabel 3), sehingga senyawa 2 diidentifikasi sebagai asam galat (Gambar 2).

Senyawa 3

Padatan putih, t.l. 298-301 °C, UV (MeOH) λ_{maks} nm 254 (log ϵ 3,2) dan 364 (log ϵ 2,8); IR (KBr) ν_{maks} cm^{-1} 3429, 1651, 1437, 1020; 1H -NMR (aseton- d_6 , 500 MHz) 6,27 (1H, d, J = 2,0 Hz, H-6), 6,54 (1H, d, J = 2,0 Hz, H-8), 8,15 (2H, d, J = 9,1 Hz, H-2; H-6'), 7,02 (1H, d, J = 9,1 Hz, H-3'; H-5'). ^{13}C -NMR (aseton- d_6 , 125 MHz) δ_C (ppm): 165,0 (C-2), 104,0 (C-3), 176,0 (C-4), 163,0 (C-5), 99,1 (C-6), 157,8 (C-7), 94,5 (C-8), 157,8 (C-9), 108,0 (C-10), 123,9 (C-1'), 130,5 (C-2', C-6'), 116,3 (C-3', C-5'), 163,0 (C-4').

Struktur Kimia Senyawa 3

Senyawa 3 diperoleh berupa padatan putih dengan titik leleh 298-301°C. Spektrum UV senyawa 3 menunjukkan adanya dua pita serapan pada λ_{maks} 254 dan 364 nm. Spektrum IR senyawa 3 menunjukkan adanya gugus -OH yang teramati pada ν_{maks} 3429 cm^{-1} dan regang C-O pada ν_{maks} 1020 cm^{-1} . Adanya kerangka flavon ini didukung pula oleh spektrum 1H NMR yang menunjukkan adanya dua proton yang terjodoh secara meta pada δ_H 6,34 (1H, d, 1,9) dan pada δ_H 6,11 (1H, d, 1,9) pada cincin B. Spektrum ^{13}C NMR menunjukkan adanya 15 sinyal karbon. Berdasarkan data DEPT 135, kelimabelas karbon tersebut terdiri atas tujuh metin sp^2 yang beresonansi pada daerah δ_C 96,1 – 129,4 ppm, enam karbon kuartener sp^2 teroksigenasi yang beresonansi pada medan lemah δ_C 159,8 – 165,9 ppm, serta satu gugus karbonil yang beresonansi pada δ_C 183,5 ppm. Data NMR senyawa 3 dibandingkan dengan senyawa apigenin dari tanaman *desmotachia bipinnata* (L).²⁵ Hasil perbandingan menunjukkan bahwa kedua senyawa memiliki kesesuaian yang sangat tinggi (Tabel 4), sehingga senyawa 3 diidentifikasi sebagai apigenin (Gambar 3).

Setelah didapatkan 3 struktur kimia senyawa tersebut, kemudian lanjutkan dengan uji antiproliferasi ketiga senyawa tersebut, dan peroleh hasil IC_{50} berturut turut 23,45 untuk senyawa 1, 17,92 untuk senyawa 2 dan 12,96 untuk senyawa 3. Hasil lengkap IC_{50} tertera seperti pada tabel 5.

Kesimpulan dari penelitian ini yaitu tiga senyawa telah disolasi dan merupakan senyawa yang baru ditemukan pada daun Rasamala yaitu asam-3,4 dihidroksi benzoat (1), asam galat (2), apigenin (3). Ketiga senyawa tersebut adalah metabolit sekunder dari daun Rasamala yang dapat menghambat proliferasi sel kanker lidah manusia *in vitro*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kepada direktur LPDP kementerian Keuangan Republik Indonesia yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Global Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 2011; 59: 225-249.
2. Johnson NW, Warnakulasuriya S, Gupta PC, Dimba E, Chindia M, Otoh EC, Sankaranarayanan R, Califano J, Kowalski L. Global oral health inequalities in incidence and outcomes for oral cancer: Causes and solutions. *Adv. Dent. Res.* 2011; 23: 237-246.
3. Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral Cancer: Clinical Features. *Oral Oncol.* 2010; 46: 414-417.
4. Bello IO, Soini Y, Salo T. Prognostic Evaluation of Oral Tongue Cancer: Means, Markers and Perspectives (I). *Oral Oncol.* 2010; 46, 630-635.
5. Braakhuis BJ, Bloemena E, Leemans CR, Brakenhoff RH. Molecular Analysis of Surgical Margins in Head and Neck Cancer: More Than a Marginal Issue. *Oral Oncol.* 2010; 46, 485-491.
6. Shah JP, Gil Z. Current concepts in management of oral cancer- surgery. *Oral Oncol.* 2009; 45: 394-401.
7. Yen CY, Liang SS, Han LY, Chou HL, Chou CK, Lin SR, Chiu CC. Cardiotoxin III inhibits proliferation and migration of oral cancer cells through MAPK and MMP signaling. *J scie world.* 2013; 12: 324-340.
8. Manoharan S, Singh RB, Balakrishnan S. Chemopreventive Mechanisms of Natural Products in Oral, Mammary and Skin Carcinogenesis: An Overview . *The Open nutraceutic.* 2009; 2: 52-63.
9. Tan W, Lu J, Huang M, Li Y, Chen M, Wu G, Gong J, Zhong Z, Xu Z, Dang Y, Guo J, Chen, X, Wang Y. Anti-cancer Natural Products Isolated from Chinese Medicinal Herbs. *Chinese Med.* 2011; 6: 27-37.
10. Bayala B, Bassole INH, Scifo R, Gnoula C, Morel L, Labaccaro JMA, Simpore J. Anticancer activity of essential oils and their chemical component. *Am.J. cancer. Res.* 2014; 4(6) 591-607.
11. Liu Z, Peiyong Y, Newman RA. Sweet gum fruit extract as a therapeutic agent. *Pct inf. Appl.* 2010; 24 (5): 234-238.
12. Kuniyoshi S, Yuko F, Reiko T, Shunyo M, Takao Y. New cytotoxic oleanane- type triterpenoids from the cone of *Liquidambar styraciflua*. *J Nat Prod.* 2004; 67: 1088-1093
13. El-Readi MZ, Eid HH, Ashour ML, Eid SY, Labib RM, Sporer F, Wink M. Variation of the Chemical Composition and Bioactivity of Essential Oils from Leaves and Stems of *Liquidambar styraciflua* (*Altingiaceae*). *J. Pharm and Pharmacol.* 2013; 65 (11): 1653-1663.
14. Zhang J, Chou G, Liu Z, Gar KH. *In vitro* Cytotoxicity and Antioxidation of a Whole Fruit Extract of *Liquidambar formosana* Exerted by Different Constituents. *European Journal of Medicinal Plants* 2015; 6(1): 34-44.
15. Shang HJ, Li DY, Wang, WJ, Li ZL, Hua HM. Three new diterpenoids from the resin of *Liquidambar formosana*. *Nat Prod Res.* 2013; 34(3): 127-13.
16. Kim HH, Yi HS, Hwan MO, Hyuk KH, Ra KS, Lee MW.. Anti oxidative and anti-proliferative activity on Human Prostate Cancer Lines of the phenolic compounds from *Corylopsis coreana* Uyeki. 2013; 18: 4876-4888.
17. Jung US, Yoon JL, Park MH, Moon JB.. Anti-inflammatory compositions containing extracts of *Corylopsis coreana* and *Erythronium japonicum*. *Molecules.* 2014;
18. Pramono AA, Djam'an DF. Tumbuhan rasamala. Balai Penelitian dan Pengembangan Teknologi Perbenihan. Bogor. 2012.
19. Kanjilal PB, Kotoky R, Singh RS. Chemical composition of the leaf oil of *Altingia excelsa* Nornha. *Flavour Fragr J.* 2003; 18: 449-450.
20. Dewick PM. Medicinal Natural Product a Biosynthesis Approach. John Willey and Sons. London. 2009.
21. Supriatno. Cis- Platinum Meningkatkan Apoptosis dan Hambatan Invasi Sel Kanker Lidah Manusia in Vitro. *MIKGI.* 2008; 10: 73-78
22. Supratman U. Elusidasi Struktur Senyawa Organik. Edisi V. Jurusan Kimia FMIPA Unpad. Jatinangor. 2010.
23. Gurial M, Mitra P, Ghosh T, Gupta S, Basu B, Mitra PK. 3,4 diHidroxyBenzoic acid Isolated from the Leaves of *Ageratum conyzoides* L. *EJBB.* 2013; 1(4): 25-28.

24. Gangadhar M, Bhavana P, Sunil Y, Datta S. Isolation and Characterisation og Gallic Acid from *Terminalia bellerica* and its effect on Carbohydrate Regulatory Sistem *In Vitro*. IJRAP. 2011; 2(2): 559-562.
25. Awaad AS, Mohamed NH, Maitland DJ, Soliman GA. Anti-ulceragenic activity of extract and some isolated flavonoids from *desmotachia bipinnata* (L) stapf. Rec. Nat. Prod. 2008; 2(3):76-82.