

Identifikasi molekular dan aktivitas antikanker alkil fenol dari minyak kulit biji jambu mete (*Anacardium occidentale* L) asal pulau Timor

Molecular identification and anticancer activity of alkylphenol from cashew nut shell oil (*Anacardium occidentale*) grown In Timor Island

Antonius R B Ola^{1, *)}, Zullies Ikawati³⁾, Sismindari³⁾, Ermelinda D Meye²⁾ dan Bibiana Dho Tawo¹⁾

¹⁾ Jurusan Kimia, Universitas Nusa Cendana, Kupang, NTT

²⁾ Jurusan Biologi, Universitas Nusa Cendana, Kupang, NTT

³⁾ Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Abstrak

Penelitian mengenai isolasi asam anakardat dan kardanol dalam cairan kulit biji jambu mete (CKBM) dan uji sitotoksitas terhadap sel kanker HeLa telah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi asam anakardat dan kardanol dalam cairan kulit biji jambu mete serta menguji sitotoksitas asam anakardat dan kardanol pada sel kanker HeLa.

Asam anakardat diisolasi sebagai garam kalsium anakardat dan selanjutnya dihidrolisis dengan asam klorida menghasilkan asam anakardat. Larutan amoniak kemudian ditambahkan ke CKBM bebas asam dan diekstrak dengan heksana/etil asetat (98:2) untuk memisahkan kardanol dan kemudian diekstrak dengan etil asetat/heksana (80:20) untuk memperoleh kardol. Kardanol diisolasi sebagai komponen utama dalam cairan kulit biji jambu mete asal kabupaten Kupang. Karakterisasi asam anakardat dan kardanol dilakukan dengan infra merah dan gas kromatografi-spektrokopi massa. Kajian aktivitas antikanker komponen kimia cairan kulit biji jambu mete dilakukan terhadap sel kanker HeLa dengan metode MTT. Hasil uji sitotoksitas menunjukkan bahwa CKBM, asam anakardat dan kardanol mempunyai potensi sebagai agen antikanker.

Kata Kunci : CKBM, asam anakardat, kardanol, antikanker.

Abstract

Isolation of anacardic acid and cardanol from cashew nut shell liquid and their cytotoxic activity to on ward HeLa cancer cell line has been done. The objective of this research is to isolate and identify anacardic acid and cardanol from CNSL along with their cytototoxic activity towards HeLa cancer cell lines. Anacardic acid was isolated as calcium anacardate. Hydrolisis of this acid with acid chloride yields anacardic acid . Liquor ammonia was added to the acid-free CNSL and extracted with hexane/ethyl acetate (98:2) to isolate cardanol and with ethyl acetate/hexane (80:20) to separate cardol. Cardanol was obtained as the main chemical component of CNSL derived from Kupang district. Anacardic acid and cardanol was analyzed using IR and GC-MS. Anticancer activity of chemical components of CNSL against HeLa cancer cell lines were studied using MTT. Cytotoxic activity test showed that CNSL, anacardic acid and cardanol can be developed as anticancer agent.

Key words : CNSL, anacardic acid, cardanol, anticancer.

Pendahuluan

NTT mempunyai lahan perkebunan jambu mete yang sangat luas dengan hasil utamanya adalah kacang mete. Produk samping kacang mete yang selama ini hanya menjadi sampah adalah kulit biji kacang mete. Kulit biji kacang jambu mete ini mengandung minyak yang disebut Cairan Kulit Biji Mete (CKBM) atau *Cashew Nut Shell Liquid (CNSL)*. Minyak kulit biji kacang mete ini mengandung asam anakardat, kardanol, kardol dan metil kardol dengan komposisi asam anakardat dapat mencapai 70 % (Santos dan Magalhaes, 1999; Paramashivappa et al, 2001). Asam anakardat telah diketahui mempunyai berbagai aktivitas biologis yang penting bagi kesehatan seperti antibakteri (Kubo dan Himejima, 1991; Begum et al, 2002), antikanker terhadap sel kanker sarcoma 180 ascites pada tikus, HCT-15 (colon), MCF-7 (breast), A-549 (lung), HT-1197 (bladder) dan SKOV-3/*ovary* (Itokawa et al, 1987; Lee et al, 1998; Kozubek et al, 2001), inhibitor berbagai enzim penting (Balasubramanyam et al, 2003). Dengan demikian, asam anakardat mempunyai nilai ekonomis yang cukup tinggi. Dalam penelitian ini telah dilakukan isolasi, identifikasi dan uji aktivitas biologis yakni antikanker terhadap komponen kimia minyak kulit biji jambu mete asal Kabupaten Kupang NTT.

Metodologi

Bahan

Kacang mete diambil dari Kabupaten Kupang, Nusa Tenggara Timur pada Juni 2006., HeLa Cell Line diperoleh dari Universitas Gadjah Mada

Metode

Ekstraksi cairan kulit biji Mete

Sebanyak 200 gram potongan-potongan kecil kulit biji jambu mete diekstraksi dengan 450 mL metanol menggunakan ekstraktor soxhlet. Ekstrak metanol kemudian dipekatkan dalam evaporator untuk menghilangkan pelarutnya.

Isolasi asam anakardat, kardanol, dan kardol (Paramashivappa et al, 2001)

Isolasi asam anakardat, kardanol, dan kardol dilakukan menurut metode Paramashivappa (2001). CKBM direaksikan dengan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ sambil diaduk dan kemudian asam anakardat diisolasi sebagai garam kalsium anakardat. HCl selanjutnya

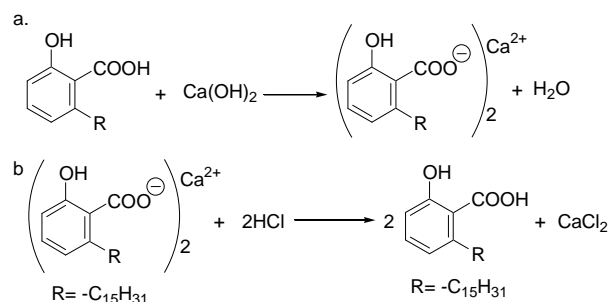
ditambahkan ke garam kalsium anakardat untuk memperoleh asam anakardat. CKBM bebas asam diperlakukan dengan ammonia dan diekstrak dengan etil asetat/heksan (80:20) untuk memisahkan kardanol, diikuti dengan heksan/etil asetat (98:2) untuk memperoleh kardol.

Uji Sitotoksik dilakukan dengan menggunakan Metode MTT

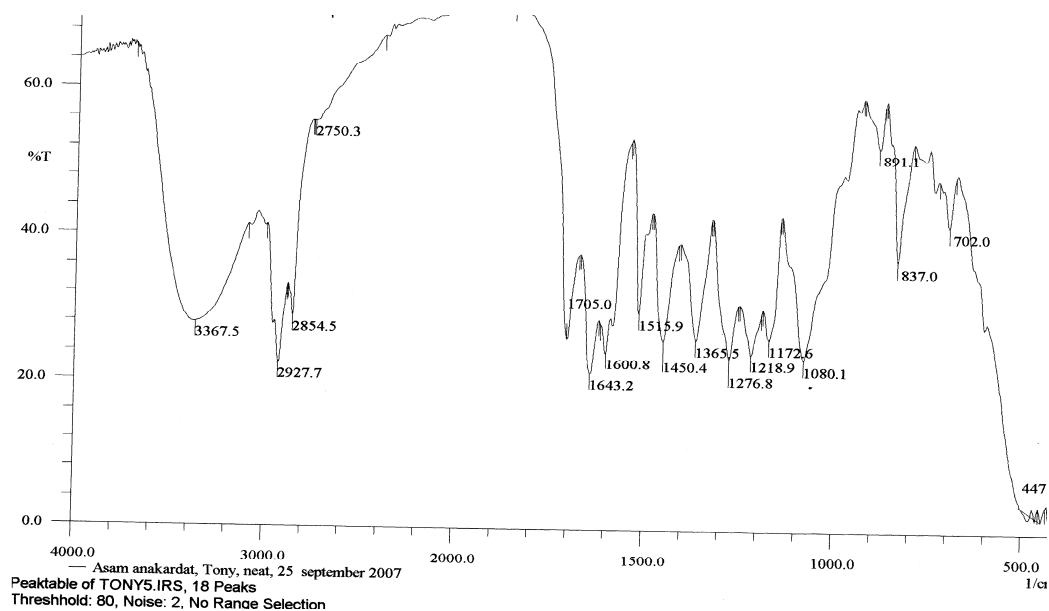
Sel didistribusikan ke dalam sumuran dan diinkubasi bersama asam anakardat dan kardanol satu seri kadar selama 24 dan 48 jam. Pada akhir inkubasi, kepada masing-masing sumuran ditambahkan $10\mu\text{l}$ MTT $2,5\mu\text{g/mL}$ dalam medium RPMI. Kemudian diinkubasi lagi semalam pada suhu 37°C . Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu. Reaksi MTT dihentikan dengan reagen *stop*, lalu diinkubasi semalam pada suhu kamar. Serapan dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 550 nm.

Hasil Dan Pembahasan

Limbah kulit kacang mete mengandung minyak kulit biji jambu mete yang secara internasional dikenal dengan nama *Cashew Nut Shell Liquid (CNSL)*. CNSL diekstraksi dengan metode sokhletasi dan maserasi menggunakan pelarut metanol. Pemisahan asam anakardat dari komponen-komponen lain dilakukan menurut prosedur Paramashiva yang didasarkan pada pembentukan garam kalsium anakardat. Asam anakardat bereaksi dengan kalsium hidroksida membentuk garam kalsium anakardat terdistribusi pada fase air menurut reaksi a. Untuk memperoleh asam anakardat maka garam kalsium anakardat dihidrolisis dengan asam klorida menurut reaksi b.



Gambar 1. Reaksi Pembentukan garam Asam anakardat



Gambar 2. Spektra IR CKBM

Kardanol dan kardol terdapat dalam fasa organik kemudian diekstrak dengan etil asetat/heksan (80:20) untuk mengisolasi kardanol dan diikuti dengan heksan/etil asetat (98:2) untuk memisahkan kardol. Kardanol dan asam anakardat selanjutnya dikarakterisasi dengan spektra Infra merah dan GC-MS.

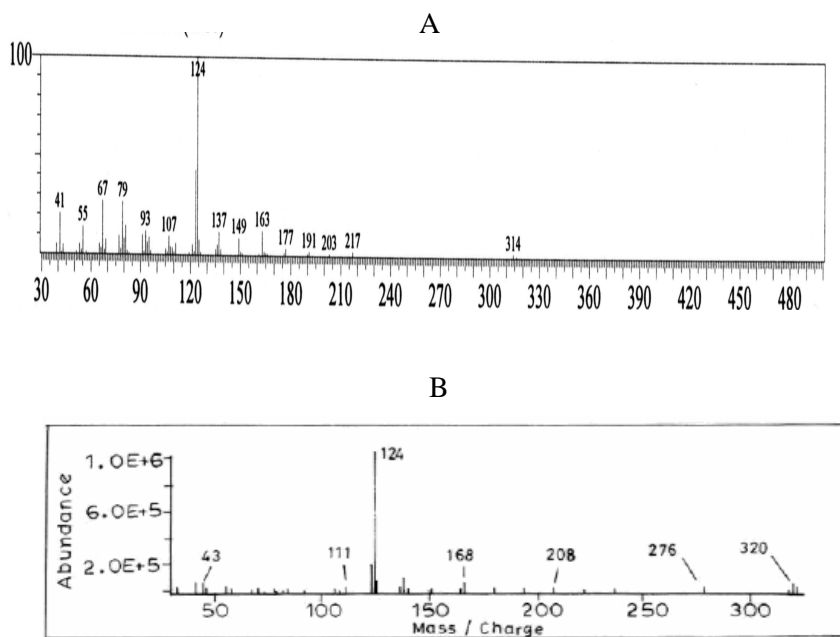
Spektra IR CKBM disajikan pada gambar 2 di bawah ini. Pita serapan pada 3367,5 merupakan ciri khas serapan gugus hidroksi alkohol sedangkan pita serapan yang lebar pada 3394,5 menunjukkan serapan khas gugus hidroksi pada asam karboksilat. *Stretching* alkena IR terlihat pada pita serapan 3008,7. Pita serapan antara 3000 hingga 2800 yaitu 2923,9 dan 2854,5 menunjukkan gugus alkil yang diperkuat dengan adanya serapan pada 1450,4 sedangkan adanya C=C aromatis ditunjukkan dengan adanya serapan sekitar 1643,2 dan 1604,7. Serapan pada 709,8 menunjukkan adanya rantai alkil yang panjang. Berdasarkan identifikasi gugus-gugus fungsi di atas dapat disimpulkan bahwa CKBM mengandung asam karboksilat yakni asam anakardat, kardanol dan kardol.

Analisis GC-MS menunjukkan bahwa minyak kulit biji jambu mete asal Kabupaten Kupang mengandung kardanol sebagai komponen utama, sedangkan asam anakardat dan kardol merupakan komponen kimia minor.

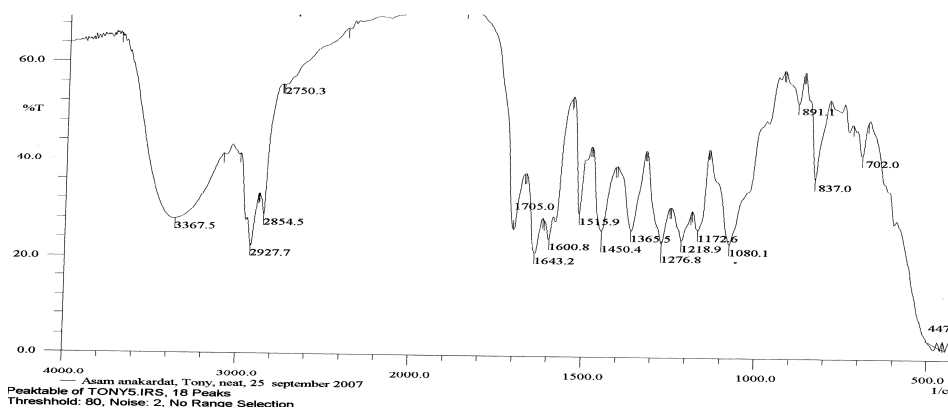
Asam anakardat telah diketahui sebagai komponen utama dalam minyak kulit biji jambu mete sedangkan kardanol ditemukan sebagai komponen kimia minor. Dekarboksilasi asam anakardat menjadi kardanol menyebabkan kardanol ditemukan sebagai komponen utama dalam minyak kulit biji jambu mete ini.

Kardanol teridentifikasi pada puncak ketujuh (puncak dasar $m/z = 108$) sedangkan kardol teridentifikasi pada puncak 11 (puncak dasar $m/z = 124$) dari kromatogram GC. Adapun asam anakardat tidak dapat diidentifikasi pada kromatogram GC-MS CKBM sebagai akibat dari sifatnya yang tidak menguap. Kardol yang teridentifikasi pada CKBM ini mempunyai berat molekul 314 yang menunjukkan adanya tiga ikatan rangkap pada rantai samping. Puncak dasar dengan $m/z = 124$ merupakan ciri khas pola pemecahan kardol. Spektra kardol ini dapat dibandingkan dengan spektra *saturated* kardol (tanpa ikatan rangkap pada rantai samping) penelitian Kumar (2002) (Gambar 3).

Karakterisasi spektra IR asam anakardat yang disajikan pada gambar 4 menunjukkan bahwa pita lebar dekat 3300 yaitu pada 3367,5 merupakan ciri khas gugus hidroksil asam karboksilat. Dua pita utama dalam daerah 3000 hingga 2800 menunjukkan adanya gugus alkil dan diperkuat pita 1450,5 dan 1365. Pita dekat



Gambar 3. (a). Spektra massa kardol (Kumar, 2002) b. Spektra massa kardol CKBM Kupang



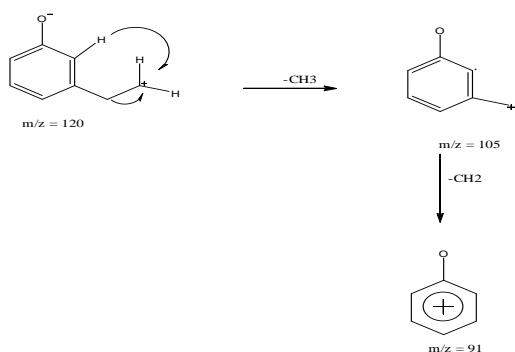
Gambar 4. Spektra IR asam anakardat

1700 yaitu 1705 adalah karakteristik gugus karbonil asam asam karboksilat. Pita-pita tajam dekat 1600 yaitu 1600,8 dan 1643 menunjukkan adanya C=C aromatik. Pita dalam daerah 709,8 menunjukkan senyawa rantai alkil yang panjang. Pita 891 menunjukkan adanya deformasi keluar bidang dari gugus tidak jenuh sedangkan pita 837 dan 891 menunjukkan adanya inti benzena tersubstitusi. Adanya asam anakardat dapat disimpulkan berdasarkan identifikasi gugus-gugus fungsi infra merah (OH, C=O, C-O,

C=C aromatic dan rantai alkyl yang panjang).

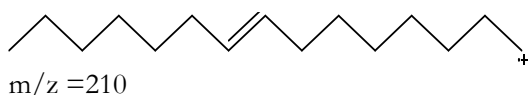
Hasil analisis GC-MS untuk senyawa asam anakardat menunjukkan bahwa pola umum pemecahan spektra massa tidak menunjukkan ion induk dengan bobot molekular yang sama dengan asam anakardat ($m/z = 346$). Asam anakardat tergolong asam lemak sehingga pemisahannya menjadi kurang sempurna dalam analisis GC-MS. Asam anakardat mengalami dua pola pemecahan pada spektra GC-MS yakni pola pemecahan pada benzene dan

pemecahan pada rantai samping. Kromatogram GC menunjukkan bahwa peak pertama, kedua dan ketiga merupakan puncak yang menunjukkan asam anakardat. Pemecahan pada benzene tersubstitusi dapat dilihat pada puncak pertama sedangkan pola pemecahan rantai samping ditemukan pada puncak 2 dan 3 dengan nilai indek similariy 97 dan 96 % sebagai C₁₅H₃₁. Puncak pertama dengan m/z 120 sebagai base peak menunjukkan pemecahan cincin aromatis dengan fragmen:

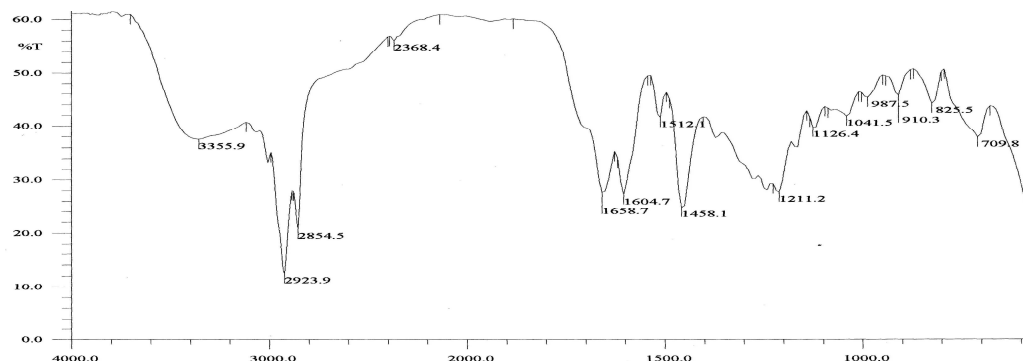


Gambar 5. Mekanisme fragmentasi cincin benzene asam anakardat yang diusulkan

Puncak kedua dan ketiga menunjukkan pemecahan rantai samping pentadekena (C₁₅H₃₀) dengan berat molekul m/z 210 didukung dengan tingkat kemiripan yang tinggi dengan spektra standar (Similarity index 96 %) dengan struktur fragmen sebagai berikut:



Gambar 6. Fragmen rantai samping C₁₅H₃₀ asam anakardat



Gambar 7. Spektra IR kardanol

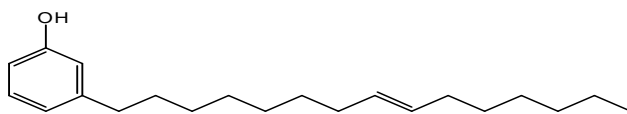
Rantai samping ini kemudian mengalami pola pemecahan rantai karbon.

Kardanol teridentifikasi pada puncak kedua kromatogram gas kromatografi dengan tingkat kemurnian sebesar 97 %.

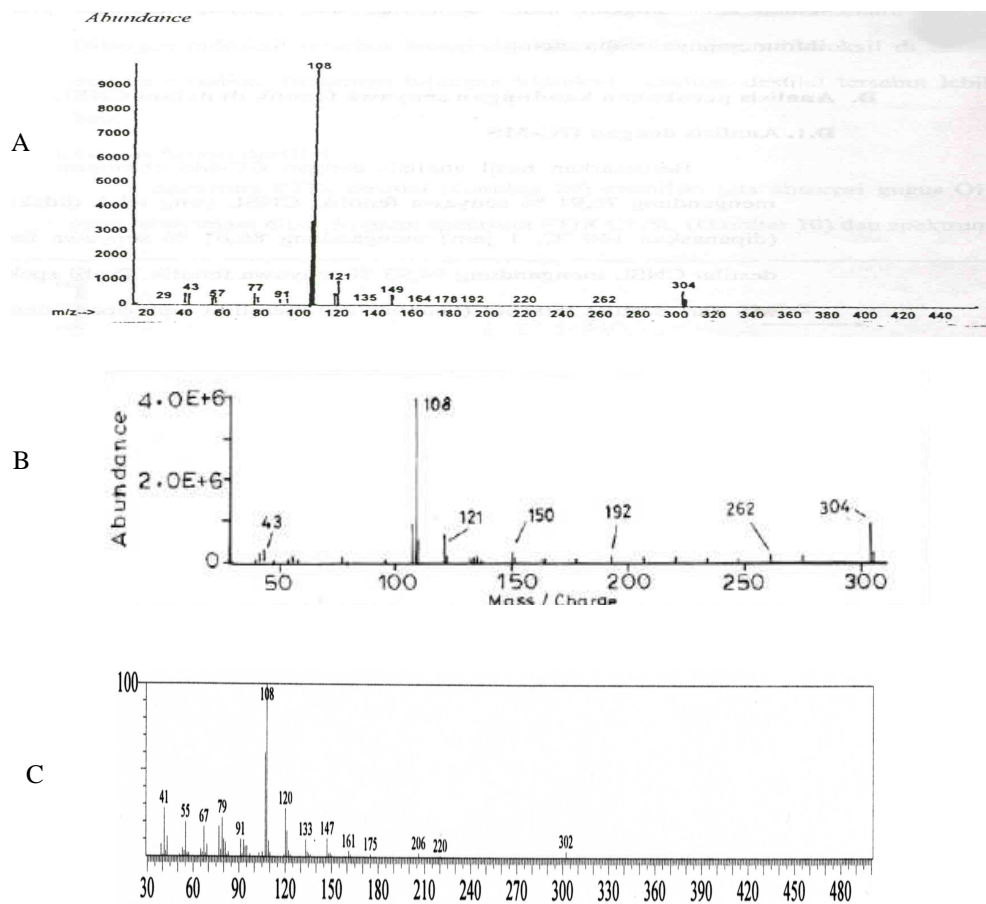
Hasil analisis IR kardanol yang disajikan pada gambar 4.3 menunjukkan bahwa pita serapan lebar lemah pada daerah 3355,9 merupakan ciri khas serapan gugus hidroksil. Dua pita utama dalam daerah 3000 hingga 2800 yaitu 2923,9 dan 2854,5 menunjukkan adanya gugus alkil dan diperkuat oleh pita 1458,1. Pita dekat 1600 yaitu 1604,7 dan 1658,7 menunjukkan adanya C=C aromatik sedangkan pita 709,8 menunjukkan senyawa tersebut memiliki rantai alkil yang panjang. Perbedaan utama spektra IR kardanol dan asam anakardat terdapat pada serapan sekitar 1700 yang mengindikasikan adanya gugus karbonil tidak terdapat pada kardanol.

Analisis GC-MS kardanol menunjukkan bahwa kulit biji jambu mete asal kabupaten Kupang mempunyai kandungan kardanol dengan 1 ikatan rangkap pada rantai samping (monoene) ditunjukkan dengan berat molekul 302. Puncak dasar dengan $m/z = 108$ merupakan ciri khas pola pemecahan kardanol (Risfaheri, 2005 dan Kumar *et al.*, 2002) dan merupakan fragmen yang stabil akibat delokalalisasi muatan (Silverstein, 1997).

Kajian aktivitas antikanker dilakukan dengan uji sitotoksitas minyak kulit biji jambu mete, asam anakardat dan kardanol terhadap kultur sel kanker leher rahim HeLa secara in vitro. Uji sitotoksitas ini dilakukan dengan metode MTT. Prinsip metode MTT didasarkan pada reaksi konversi garam Tetrazolium 3-(4,5-dimethylthiazol dipheniltetrasolium bromide)



Gambar 8. Kardanol



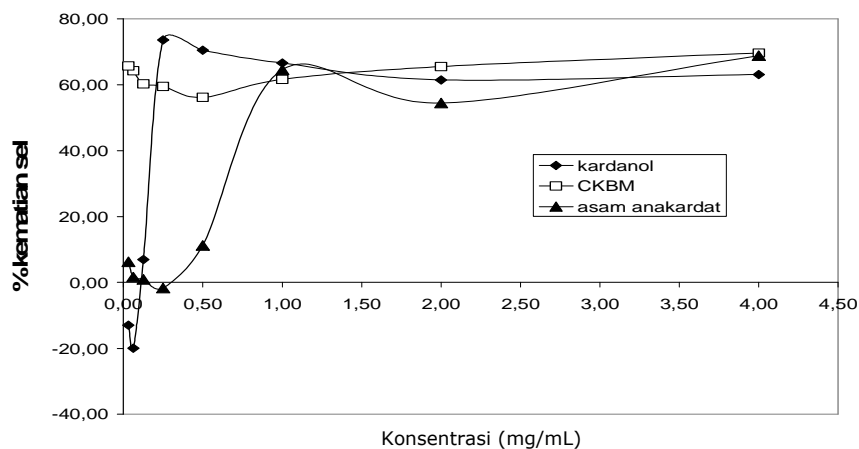
Gambar 9. Perbandingan spektra MS kardanol yang diperoleh dari penelitian a) Risfaheri (2005), b) Kumar (2002) c. Ola dkk dalam penelitian ini.

menjadi produk formazan oleh mitokondria sel yang viable. Produk formazan yang dihasilkan berwarna biru yang selanjutnya dihitung intensitasnya dengan menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 550 nm.

Dari hasil uji sitokisitas terhadap kultur sel Hela, diperoleh bahwa CKBM dan senyawa yang diisolasi daripadanya memiliki efek sitotoksik yang cukup kuat dengan potensi yang bervariasi. CKBM memiliki potensi tertinggi, di mana pada dosis 0,0312 mg/mL dapat menyebabkan kematian sel sebesar 65,73 %. Namun peningkatan dosis tidak memberikan

kenaikan efek sitotoksik yang bermakna. Kenaikan dosis hingga 4,0 mg/mL hanya memberikan peningkatan efek kematian sel menjadi 69,66%. Hal ini dimungkinkan karena kelarutan senyawa yang sangat kecil pada media uji sehingga walaupun bobot penimbangan ditingkatkan, kadar senyawa aktif terlarut yang berefek sitotoksik tidak meningkat.

Hal yang serupa dijumpai pada kardanol dan asam anakardat. Asam anakardat mulai menyebabkan kematian sel pada dosis 0,500 mg/mL dengan persen kematian sel sebesar 11,27%, dimana pada dosis uji tertinggi yaitu



Gambar 10. Hasil uji sitotoksitas senyawa asam anakardat, kardanol dan cairan kulit biji jambu mete (CKBM) terhadap kultur sel HeLa. Data merupakan hasil dua kali replikasi masing-masing secara triplikasi

4,00 mg/mL dapat menyebabkan kematian sel setara dengan CKBM yaitu 68,86%. Sedangkan kardanol sedikit lebih poten, di mana efek sitotoksik mulai terlihat pada konsentrasi 0,13 mg/mL dengan kematian sel sebesar 6,93%. Namun sama dengan dua senyawa uji lainnya, pada konsentrasi uji tertinggi yaitu 4,00 mg/mL kardanol juga dapat menyebabkan kematian sel di atas 60 %. Adanya pola kematian sel kanker yang kurang tergantung dosis dapat disebabkan oleh sifat kelarutan CKBM, asam anakardat dan kardanol dalam pelarut yang digunakan.

Kesimpulan

Kardanol dapat dipisahkan sebagai komponen utama dalam minyak kulit biji

jambu mete asal kabupaten Kupang. Asam anakardat dapat diisolasi sebagai komponen kimia lain dari cairan kulit biji jambu mete (CKBM) sebagai akibat dekarboksilasi pada tahap ekstraksi soklet. Cairan kulit biji jambu mete, kardanol dan asam anakardat mempunyai efek sitotoksik terhadap sel HeLa dengan potensi yang bervariasi.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada DIKTI atas dana bantuan penelitian lewat proyek Hibah pekerti. Penelitian ini sepenuhnya dibiayai oleh program Hibah Pekerti tahun 2007.

Daftar Pustaka

- Balasubramanyam K., Swaminathan V., Ranganathan A., and Kundu T. K.. 2003. Small Moleculer Modulators of Histone Acetyltransferase p300. *J. Bio. Chem.* 278, 19134-19140
- Begum Parvin et al, 2002. Zoosporocidal Activites of Anarcadic Acid against *Aphanomyces cochliodes*. *Z. Naturforsch* 57c, 874-882
- Itokawa H et al, 1987. Antitumor Principle from *Ginkgo Biloba L.* *Chem. Pharm. Bull.* 35, 3016-3020
- Kozubek A, Zarnowski R, Stasiuk M and Gubernator J, 2001. Natural Amphiphilic phenols as bioactive compounds. *Cellular & Molecular Biology Letters* 6:351-355
- Kumar PP, Paramashivappa R, Vithayathil PJ and Rao AS. 2001. Process for Isolation of of Cardanol from Technical Cashew (*Anacardium Occidentale L.*) Nut Shell Liquid. *J. Agric Food Chem.* 50: 4705-4708
- Lee Ji S, Cho Y S, Park E J, Kim J, Oh W K, Lee H S and Ahn Jo S.1998. Phospholipase C α 1 Inhibitory Principles from the Sarcotestas of *Ginkgo biloba*. *J. Nat. Prod.*, 61, 867-871

- Paramashivappa R, Kumar PP, Vithayathil PJ and Rao AS. 2001. Novel Method for Isolation of Major Phenolic Constituents from Cashew (*Anacardium Occidentale* L.) Nut Shell Liquid. *J. Agric Food Chem.* 49 (5): 2548-2551
- Risfaheri. 2005. Kajian Pemanfaatan Kardanol dari Cairan Kulit Biji Mete Sebagai Substitusi Fenol Dalam Formulasi Perekat Fenol Formaldehida. Disertasi, Sekolah Pasca Sarjana IPB.
- Santos dos L.M. and Magalhaes de C.G. 1999. Utilization of Cashew Nut Shell Liquid from *Anacardium occidentale* as Starting Material for Organic Synthesis: A Novel Route to Lasiodipladin from Cardols. *J.Braz. Chem. Soc.* 10: 13-20
- Silverstein R M and Webster F X. 1997. Spectrometric Identification of Organic Compounds. John Wiley & Sons Inc, New York.

-
- Korespondensi : Antonius RB Ola
Jurusan Kimia, Universitas Nusa Cendana, Kupang,
Nusa Tenggara Timur - Indonesia
E-mail : ola.antonius@gmail.com