

Majalah Farmasi Indonesia, 14(4), 216 - 225, 2003

Aktivitas antikarsinogenik senyawa yang berasal dari tumbuhan

The anticarcinogenic activity of plants compounds

Sugiyanto, B. Sudarto, Edy Meiyanto, Agung Endro Nugroho dan Umar A. Jenie

Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada

Abstrak

Penelitian ini menguji khasiat ekstrak daun dari tumbuhan ngokilo (*Gynura procumbens*), beluntas (*Pluchea indica*), murbei (*Morus alba*) dan tapak doru (*Vinca alba*). Dari keempat tumbuhan yang dipilih hanya ekstrak etanol daun ngokilo yang menunjukkan aktivitas antikarsinogenik terhadap pertumbuhan tumor paru mencit. Tahap berikutnya dilakukan isolasi dan identifikasi senyawa berkhasiat pada ngokilo (*Gynura procumbens*) dan kemudian diuji aktivitas karsinogenik terhadap kultur sel mieloma dan sel vero.

Dari penelitian ini, fraksi non-polar ekstrak etanol daun ngokilo tidak menunjukkan aktivitas antikarsinogenik, sedangkan fraksi polarnya menunjukkan aktivitas antikarsinogenik. Pada fraksi polar ekstrak etanol tersebut setidaknya ditemukan tiga flavonoid golongan flavon atau flavonol. Di antara ketiga flavonoid tersebut, dua flavonoid terbukti mempunyai aktivitas penghambatan pertumbuhan sel mieloma dan sel Vero.

Kata kunci : ngokilo, *Gynura procumbens*, antikarsinogenik, flavonoid.

Abstract

The study was conducted to observe the effect of extracts of ngokilo (*Gynura procumbens*), beluntas (*Pluchea indica*), murbei (*Morus alba*) dan tapak doru (*Vinca alba*) leaves. Showed anticarcinogenic activity on lung tumor growth of mice. In the next step, compounds having anticarcinogenic effect was isolated and identified, and evaluated on the cultures of mieloma and Vero cells.

The results showed that non-polar fraction of ethanol extract of ngokilo leaves did not have anticarcinogenic activity, whereas the polar fraction show anticarcinogenic activity. At least there were three flavonoids (flavon or flavonol groups) in this polar fraction. It was only two of these flavonoids inhibit the growth of myeloma and Vero cells.

Key words : ngokilo, *Gynura procumbens*, anticarcinogenic, flavonoid.

Pendahuluan

Kanker merupakan salah satu ancaman utama dibidang kesehatan. Di Inggris, kematian akibat penyakit kanker menduduki peringkat ke-2 setelah penyakit kardiovaskuler. Sedangkan di Indonesia, kematian akibat kanker mencapai 4,3% atau menduduki peringkat ke-6 (Anonim, 1988).

Beberapa usaha pengobatan kanker secara intensif telah dilakukan meliputi pengobatan secara fisik, dengan pembedahan maupun pengobatan dengan senyawa kimiawi

(khemoterapi) (Linder, 1985). Sampai saat ini obat kanker yang benar-benar efektif belum ditemukan. Hal ini karena rendahnya selektivitas obat-obat antikanker yang digunakan maupun karena belum diketahuinya dengan jelas proses karsinogenesis itu sendiri.

Usaha penyembuhan kanker dengan obat (farmakoterapi) atau dengan senyawa kimia (khemoterapi) pada umumnya belum mampu memberikan hasil yang memuaskan sehingga dijumpai cara-cara pengobatan alternatif antara lain dengan obat tradisional.

Cara-cara pengobatan dengan menggunakan tanaman obat tradisi tersebut umumnya belum mempunyai dasar yang rasional baik secara laboratoris maupun klinis.

Salah satu dari tumbuhan / bagian dari tumbuhan yang digunakan sebagai obat kanker adalah daun ngokilo (*Gynura procumbens*), beluntas (*Pluchea indica*), murbei (*Morus alba*) dan tapak doro (*Vinca alba*). Salah satu dari sedikit bukti laboratoris terhadap beberapa tumbuhan yang digunakan sebagai obat antikanker tersebut, telah dibuktikan bahwa ekstrak etanol daun ngokilo (*Gynura procumbens*) mampu menghambat pertumbuhan tumor paru akibat benzo(a)piren sebesar 23 % (Sugiyanto *et al.*, 1993). Dalam rangka memperoleh kebenaran ilmiah tentang khasiat tumbuh-tumbuhan tersebut dalam menghambat pertumbuhan kanker maka perlunya diuji secara laboratoris efek antikarsinogenik dan identifikasi senyawa berkhasiatnya.

Metodologi

Bahan penelitian

Tumbuhan daun ngokilo (*Gynura procumbens* (Lour) Merr) diperoleh dari budidaya sendiri di kebun tanaman obat Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM. Tumbuhan beluntas (*Pluchea indica*), murbei (*Morus alba*) dan tapak doro (*Vinca alba*) diperoleh dari masyarakat disekitar kampus UGM. Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah etanol, metanol, asam asetat, butanol, heksan, kloroform, aluminium klorida, sitoborat dan eter (E. Merck, Germany); benzo(a)piren atau B(a)P, dan N'-nitro-N''-metil-nitroso guanidin atau NTG (Sigma Chemical Co.).

Hewan uji yang digunakan pada uji antikarsinogenik *in vivo* adalah mencit (*Mus musculus*) galur swiss usia 2 - 2,5 bulan (Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi, Fakultas Farmasi UGM). Sedangkan untuk uji karsinogenik *in vitro* digunakan sel Vero yang berasal dari ginjal kera Afrika, merupakan keturunan ke-113 (ATCC), dan digunakan sel meiloma dari Merwin Plasma Cell Tumor-11 (MPC-11) yang diisolasi dari mencit balb/c, kedua jenis sel tersebut diperoleh dari Laboratorium Ilmu Hayati UGM.

Cara Kerja

Pembuatan ekstrak daun tumbuhan

Ekstrak etanol dan eter diperoleh dengan melakukan ekstraksi menggunakan alat Soxhlet dengan masing-masing menggunakan pelarut etanol 80 % dan eter murni. Ekstrak air dibuat dengan cara

pembuatan dekok dengan kepekatan 20% b/v bahan daun yang telah dikeringkan.

Ekstrak etanol daun yang telah dikeringkan berturut-turut diekstraksi dengan heksan dan etilasetat. Fraksi heksan dan etilasetat ditampung dan dikeringkan dengan penguapan suhu rendah (< 40°C) dan dengan pengurangan tekanan. Residu yang diperoleh disebut fraksi residu.

Uji antikarsinogenik dengan metoda *New-born mice*

Metode yang digunakan mengacu pada percobaan pendahuluan (Kapiltunik *et al.*, 1977). Pada percobaan ini, anak mencit yang baru lahir dipisahkan menjadi dua kelompok, satu kelompok segera disuntik B(a)P pada hari ke-1, ke-8 dan ke-15 dengan dosis masing-masing 0.2, 0.4, dan 0.8 µmol, sedangkan kelompok kedua disuntik dengan DMSO sebagai kontrol. Pada usia 25 hari, anak mencit dipisahkan dari induknya dan dipisahkan antara jantan dengan betina. Sebagian perlakuan B(a)P tanpa perlakuan ekstrak tumbuhan dikandangkan sendiri disebut sub-kelompok kontrol positif kanker demikian pula perlakuan DMSO tanpa perlakuan ekstrak tumbuhan dinamakan kontrol negatif kanker.

Kelompok mencit yang disuntik B(a)P, diluar sub-kelompok kontrol positif kanker, diberi suspensi ekstrak daun masing-masing tumbuhan secara oral dengan dosis setara dengan 50 dan 100 mg serbuk daun kering per kg berat bada mencit. Sebagian dari kelompok kontrol negatif juga mendapatkan perlakuan ekstrak tersebut untuk mengetahui apakah ada efek karsinogenik dari tumbuhan tersebut.

Uji antimutagenesis ekstrak daun tumbuhan

Percobaan ini dilakukan dengan metoda *reversed mutation* dengan menggunakan bakteri *Salmonella typhimurium* JCM 6977 (Chu, 1971; Ames *et al.*, 1975). Bila bakteri ini di inokulasi pada media tanpa histidin dan diberi suatu mutagen yaitu B(a)P atau NTG, dengan enzim pengaktivasi maka akan terjadi mutasi balik dan bakteri tersebut akan mampu tumbuh. Apabila ekstrak daun dapat menghambat pertumbuhan bakteri tersebut maka ekstrak tersebut bersifat antimutagenik. Uji antimutagenesis ini dilakukan terhadap fraksi larut etil asetat, fraksi larut kloroform dan fraksi residu dari ekstrak etanol daun *Gynura procumbens*.

Uji sitotoksitas ekstrak etanol, fraksi residu dan bercak hasil KLT

Pada uji sitotoksitas, digunakan pembanding endoksan dan doksorubisin sebagai obat antikanker golongan senyawa pengalkil (kontrol positif). Pemakaian endoksan dilakukan baik

menggunakan enzim pengaktivasi (S9) maupun tanpa enzim pengaktivasi. Uji sitotoksitas bercak kromatogram dilakukan pula terhadap sel meiloma dan Vero.

Identifikasi senyawa berkhasiat pada ekstrak daun ngikolo

Langkah pertama yaitu menggunakan kromatografi lapis tipis. Dalam analisis tersebut, dicoba beberapa sistem kromatografi dengan menggunakan fase diam selulosa tetapi berbeda komposisi fase gerak. Sistem lain yang digunakan dengan fase diam silika gel G dengan beberapa macam komposisi fase gerak yang berbeda pula. Untuk mengidentifikasi struktur senyawa berkhasiat tersebut digunakan analisis bercak dari kromatogram menggunakan kromatografi gas, spektroskopi resonansi magnetik inti (H-NMR 600 MHz) dan spektrometri massa (GC-MS) (Lab. Biomaterial Chemistry, Graduate School of Biotechnology, Osaka University Japan).

Hasil dan Pembahasan

Hasil uji antikarsinogenik ekstrak daun

Hasil percobaan antikarsinogenik *in vivo* menggunakan metoda *new born mice* disajikan pada tabel I-III. Dari penelitian nampak bahwa ekstrak air dan eter tidaklah mempunyai efek menghambat pertumbuhan tumor yang nyata. Baik persentasi insidensi timbulnya tumor maupun jumlah nodul tumor tiap mencit tidaklah berbeda dengan kelompok kontrol positif kanker.

Pada pemberian ekstrak etanol *Gynura procumbens* (daun ngokilo) dosis 50 dan 100 mg/kg BB dapat menghambat pertumbuhan tumor dengan mengurangi insidensi timbulnya tumor maupun mengurangi jumlah nodul tumor dibandingkan dengan kanker ($P < 0,05$). Sedangkan pemberian ekstrak etanol daun *Pluchea indica*, *Vinca alba* dan *Morus alba* tidak menunjukkan penghambatan tumor (tabel III).

Tabel I. Hasil uji antikarsinogenik ekstrak air daun beberapa tanaman dengan karsinogen B(a)P.

Ekstrak air daun, dosis (mg/kg BB)	Jumlah mencit	Jumlah mencit dg. tumor	Jumlah nodul tumor/mencit
Kontrol positif kanker	15	15	6,3 ± 1,5
<i>G. procumbens</i> , 100	20	20	6,5 ± 2,3
<i>G. procumbens</i> , 50	20	20	7,0 ± 1,8
<i>P. indica</i> , 100	12	12	6,5 ± 2,8
<i>P. indica</i> , 50	10	10	7,1 ± 1,0
<i>Vinca alba</i> , 100	15	14	6,3 ± 3,1
<i>Vinca alba</i> , 50	13	13	6,8 ± 2,4
<i>Morus alba</i> , 100	13	13	5,7 ± 3,0
<i>Morus alba</i> , 50	14	14	6,2 ± 2,1

Tabel II. Hasil uji antikarsinogenik ekstrak eter daun beberapa tanaman dengan karsinogen B(a)P.

Ekstrak eter daun, dosis (mg/kg BB)	Jumlah mencit	Jumlah mencit dg. tumor	Jumlah nodul tumor/mencit
Kontrol positif kanker	15	15	6,3 ± 1,5
<i>G. procumbens</i> , 100	20	20	7,5 ± 1,3
<i>G. procumbens</i> , 50	20	20	7,3 ± 0,9
<i>P. indica</i> , 100	18	17	6,3 ± 2,0
<i>P. indica</i> , 50	18	15	7,1 ± 1,2
<i>Vinca alba</i> , 100	15	15	6,4 ± 2,5
<i>Vinca alba</i> , 50	20	18	6,6 ± 2,8
<i>Morus alba</i> , 100	13	13	6,1 ± 2,1
<i>Morus alba</i> , 50	15	15	6,3 ± 2,0

Tabel III. Hasil uji antikarsinogenik ekstrak etanol daun beberapa tanaman dengan karsinogen B(a)P.

Ekstrak etanol daun, dosis (mg/kg BB)	Jumlah mencit	Jumlah mencit dg. tumor	Jumlah nodul tumor/mencit
Kontrol positif kanker	16	16	7,0 ± 2,1
<i>G. procumbens</i> , 100	18	11	4,3 ± 1,5*
<i>G. procumbens</i> , 50	15	14	5,8 ± 2,0*
<i>P. indica</i> , 100	18	17	6,0 ± 4,0
<i>P. indica</i> , 50	18	18	6,4 ± 1,2
<i>Vinca alba</i> , 100	15	15	6,4 ± 3,3
<i>Vinca alba</i> , 50	20	20	6,6 ± 2,8
<i>Morus alba</i> , 100	13	13	7,1 ± 1,1
<i>Morus alba</i> , 50	15	15	6,3 ± 1,0

* Lebih rendah dibandingkan kontrol positif kanker ($P < 0,05$)

Hasil uji mutagenesis dan antimutagenesis fraksi ekstrak etanol daun *G. procumbens*

Hasil uji mutagenesis dengan *Salmonella typhimurium* JCM 6977 (tabel IV) menunjukkan bahwa terdapat pertumbuhan pada media minimum tanpa histidin pada perlakuan fraksi kloroform ekstrak etanol daun *G. procumbens*. Ini menunjukkan bahwa fraksi kloroform dari ekstrak etanol tersebut kemungkinan terdapat senyawa yang bersifat mutagenik.

Sedangkan uji antimutagenesis dimaksudkan untuk memeriksa penghambatan proses mutagenesis pada tahap inisiasi atau promosi. Bila ekstrak dapat menghambat atau memutuskan ikatan antara mutagen dengan DNA maka proses mutagenesis akan dihambat, sehingga tidak terbentuk mutan. Tabel V menunjukkan bahwa pada media yang ditambahkan fraksi-fraksi etanol tetap menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri.

Tabel IV. Hasil uji mutagenesis beberapa fraksi ekstrak etanol daun *G. procumbens* terhadap *Salmonella typhimurium* JCM 6977

Perlakuan	Pertumbuhan bakteri pada hari ke-							Absorban
	1	2	3	4	5	6	7	
Fraksi kloroform	-	-	-	+	++	+++	+++	0.326
Fraksi etilasetat	-	-	-	-	-	-	-	0.000
Fraksi residu	-	-	-	-	±	±	±	0.000
Inokulum+Histidin	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0.583
Inokulum-Histidin	-	-	-	-	-	-	-	0.000

Keterangan : + : pertumbuhan sedikit, ++ : pertumbuhan sedang, +++ : pertumbuhan banyak, ± : pertumbuhan tidak jelas, dan - : tidak ada pertumbuhan

Tabel V. Hasil uji mutagenesis beberapa fraksi ekstrak etanol daun *G. procumbens* terhadap *Salmonella typhimurium* JCM 6977

Perlakuan	Pertumbuhan bakteri pada hari ke-							Absorban
	1	2	3	4	5	6	7	
Fraksi kloroform + NG	-	-	-	++	+++	+++	+++	0.356
Fraksi etilasetat +NG	-	-	+	+	+	+	+	0.132
Fraksi residu + NG	-	-	+	+	+	+	+	0.125
Inokulum + NTG	-	-	-	+	+	+	+	0.130
Inokulum - NTG	-	-	-	-	-	-	-	0.000

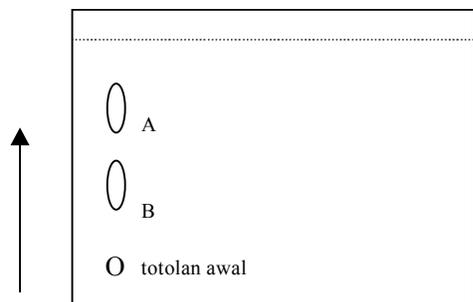
Keterangan : + : pertumbuhan sedikit, ++ : pertumbuhan sedang, +++ : pertumbuhan banyak, ± : pertumbuhan tidak jelas, dan - : tidak ada pertumbuhan. Inokulum pada media tanpa histidin

Dengan kata lain, baik fraksi larut kloroform, fraksi larut etil asetat dan fraksi residu dari ekstrak daun *Gynura procumbens* tidak mempunyai efek antimutagenesis.

Dengan hasil uji mutagenesis di atas dapat difahami bahwa efek penghambatan pertumbuhan tumor tidak terjadi pada proses mutasi material genetiknya tetapi dengan mekanisme yang lain seperti penghambatan aktivasi metabolik senyawa karsinogen atau berpengaruh pada tahap promosi atau proliferasi sel-sel tumor (Huang *et al.*, 1995; Sayer *et al.*, 1989).

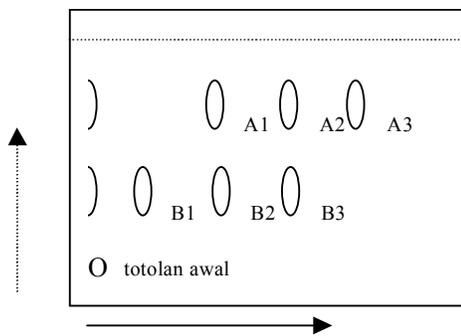
Kromatografi lapis tipis dan analisis bercak kromatogramnya

Hasil percobaan ini menunjukkan bahwa pemisahan terbaik dihasilkan dengan fase diam selulosa dan fase gerak etanol-air (1:4) memberikan 2 bercak pada kromatogram (gambar 1). Dari reaksi warna serta pemeriksaan di bawah UV mengindikasikan bahwa bercak-bercak yang dihasilkan mengandung 5-hidroksi-flavon atau 5-hidroksi flavonol yang tersubstitusi pada 3'-OH.



Gambar 1.

Gambar 1. Hasil pemisahan senyawa dengan fase diam selulosa dan fase gerak etanol – air (1:4 v/v)



Gambar 2.

Gambar 2. Hasil pemisahan senyawa dengan dari kromatogram pada gambar 1. dengan gerak butanol – asam - air (4 : 1 : 5)

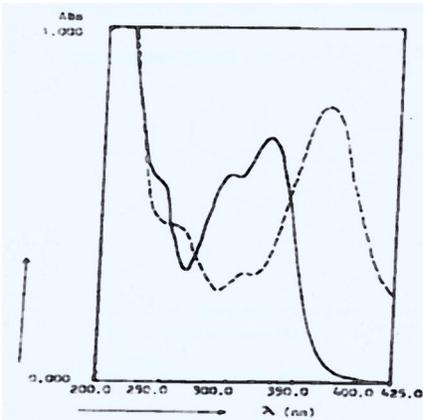
Penggunaan fase gerak n-butanol-asam asetat-air (4 : 1 : 5) untuk elusidasi kromatogram I memberikan hasil tiga bercak utama untuk masing-masing bercak pada elusi I seperti disajikan pada gambar 2.

Berdasarkan intensitas fluoresensi UV, bercak A1 merupakan bercak utama dari bercak A dan bercak B1 dan B2 merupakan bercak utama dari bercak B. Oleh sebab itu, identifikasi

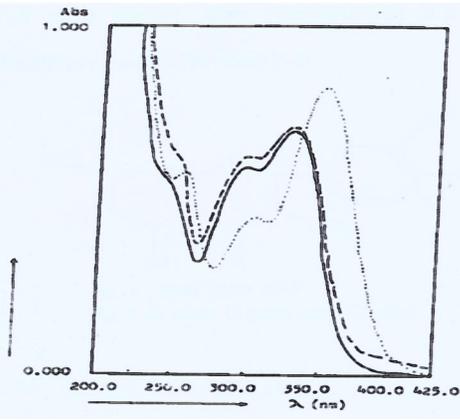
spektroskopi dilakukan terhadap bercak A1, B1 dan B2.

Identifikasi bercak kromatogram dilakukan dengan menggunakan teknik analisis dengan pereaksi geser terhadap senyawa golongan flavonoid (Markham, 1988). Dari data kromatografi yang berupa harga Rf dan warna bercak digabungkan dengan data spektrofotometri ultraviolet (Gambar 3-6) diusulkan suatu hipotesis bahwa flavonoid A1 merupakan derivat flavon dengan gugus OH pada posisi 7, 3', 4' tanpa gugus OH pada posisi 5 dan mempunyai substitusi alkoksi pada posisi 6 dan 8. Sedangkan untuk flavonoid B1 merupakan suatu derivat flavonol yang mempunyai gugus 3 OH bebas atau suatu glikosida dengan molekul gula terikat pada gugus hidroksi dari atom C3. Identifikasi dengan pereaksi metanol, AlCl₃ dan AlCl₃ + HCl, berurutan-turut menunjukkan bahwa flavonoid B1 merupakan flavonol, tanpa *ortho* di-OH, mempunyai 3,5 di-OH. Identifikasi terhadap flavonoid B2 menunjukkan bahwa senyawa tersebut mirip dengan senyawa B1

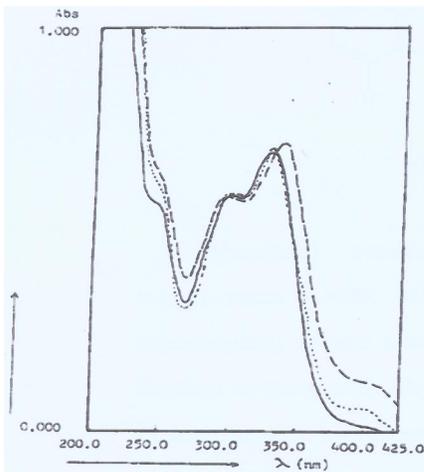
merupakan glikosida flavonol dengan molekul gula terikat pada posisi 3. Identifikasi dengan pereaksi metanol, NaOAc, AlCl₃ dan AlCl₃ + HCl, berurutan-turut menunjukkan bahwa flavonoid B2 merupakan flavonol, 7-OR, mempunyai 3',4' *ortho* di-OH, dan mempunyai 3,5 di-OH. Hipotesis senyawa flavonoid A1, B1 disajikan pada gambar 7 - 9.



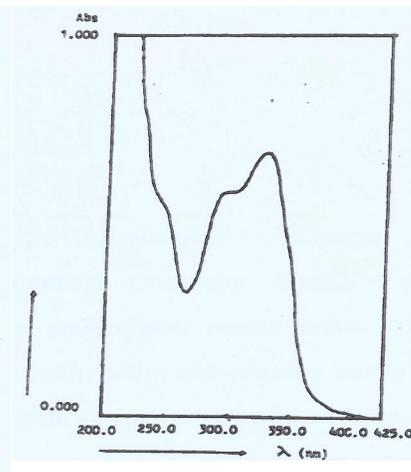
Gambar 3. Spektra flavonoid A1 dalam MeOH dan NaOH
 — = MeOH : 250, 300^s, 325
 = MeOH + NaOH : 267, 310^s, 375



Gambar 4 Spektra flavonoid A1 dalam MeOH, NaOAc dan H₃BO₃
 — = MeOH : 250, 300^s, 325
 = MeOH+NaOAc : 253, 300^s, 325
 = MeOH+NaOAc+ H₃BO₃:256,303^s,350

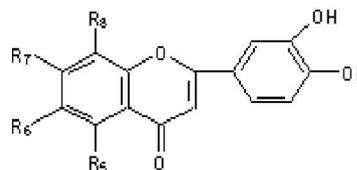


Gambar 5. Spektra flavonoid A1 dalam MeOH + AlCl₃ dan AlCl₃ + HCl
 — = MeOH: 250, 300^s, 325
 = MeOH + AlCl₃ : 250, 300^s, 328
 = MeOH + AlCl₃ + HCl : 250, 300^s, 325



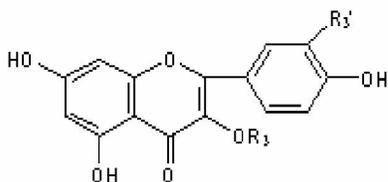
Gambar 6. Spektra hasil hidrolisis asam flavonoid dalam MeOH
 — = MeOH : 250, 300^s, 325

Identifikasi selanjutnya menggunakan spektroskopi resonansi magnetik menggunakan H-NMR 600 MHz (Lab. Biomaterial Chemistry, Graduate School of Biotechnology, Osaka University Japan) dan spektrometri massa untuk memastikan identitas senyawa aktif. Identifikasi lanjutan dengan kedua alat tersebut hanya ditujukan pada flavonoid A. Identifikasi lanjutan menggunakan data spektrum massa (Gambar 10) dan spektrum NMR (Gambar 11).



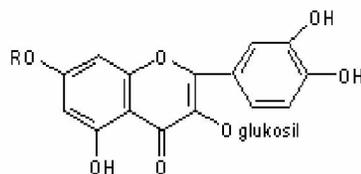
R₃ = H, Alkil atau alkoksi
 R₆ = Alkoksi dan R₈ = H
 atau
 R₆ = H dan R₈ = Alkoksi

Gambar 7. Flavonoid pada bercak A1



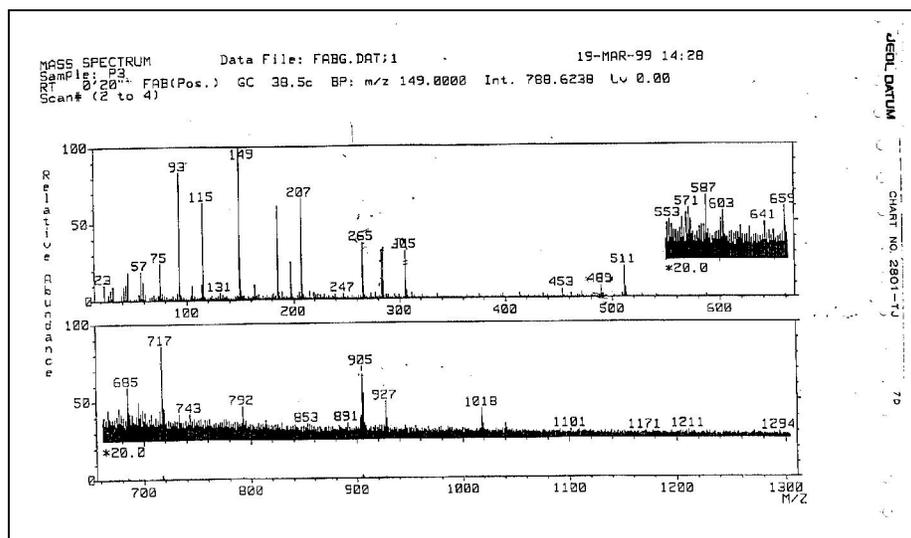
R₃ = gula atau alkil
R₃' = Alkoksi dan R₈ = H

Gambar 8. Flavonoid pada bercak

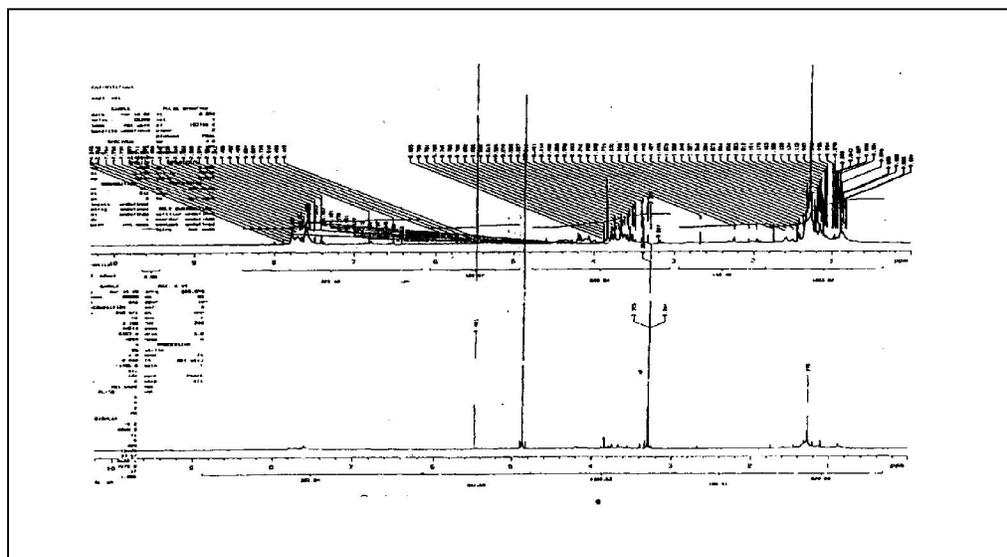


R = Alkil

Gambar 9. Flavonoid pada bercak B2



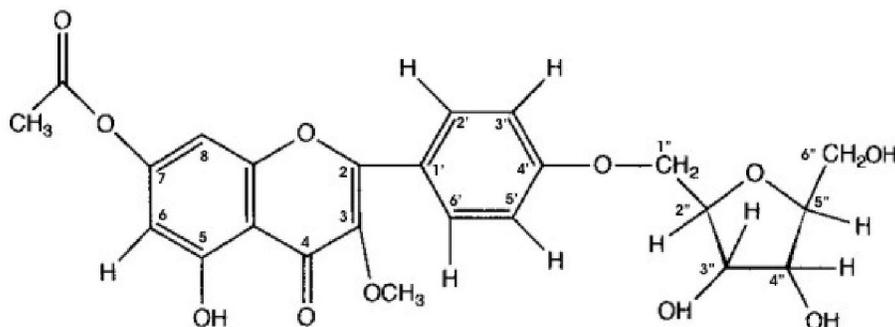
Gambar 10. Spektrum massa Flavonoid A1



Gambar 11. Spektrum NMR (proton NMR) falvonoid A1

Tabel VI. Pergeseran kimia (δ) dari sampel bercak A1

Pergeseran kimia (δ) (ppm)	Pola <i>splitting</i>	Kemungkinan asal proton dari:
3.829	<i>Singlet</i>	-OCH ₃
3.843	<i>Singlet</i>	-OOCCH ₃
3.395	<i>Doublet</i>	2H-6'' (CH ₂ OH)
3.545	<i>Doublet</i>	H-3'' atau H-4'' (-CHOH)
3.553 ⁵	<i>Doublet</i>	2H-1'' (-CH ₂ -O-)
3.665	<i>Triplet dari doublet</i>	H-5'' (-CH-O-)
3.780 ⁵	<i>Triplet dari doublet</i>	H-2'' (-CH-O-)
7.603	<i>Singlet</i>	H-8 (aromatik)
7.619	<i>Singlet</i>	H-6 (aromatik)
7.40 – 7.62	<i>Multiplet / overlap</i>	Proton aromatik dari cincin karbon

Gambar 12. Perkiraan flavanoid A1 setelah analisis berdasarkan spektrum ¹H-NMR dan spektrum massa

Dengan metoda *Fast Atomic Bombardment Mass Spectrometry* (FAB-MS) senyawa flavonoid yang diperoleh memberikan fragmen-fragmen yang muncul sebagai ion molekul pada m/z antara 0 – 511. Ion molekul di daerah m/z 553 -1294 juga terdeteksi akan tetapi ini tidak lazim. Mungkin karena adanya *noise* atau *enhancement*. Oleh sebab itu interpretasi difokuskan pada ion molekul yang muncul di bawah m/z 511.

Pada spektrum massa yang diperoleh terlihat beberapa puncak ion molekul di daerah m/z 265, 283, 305, 489 dan 511. Juga terekam ion molekul dengan m/z 149. Andaikan senyawa flavonoid terduga aglikonnya mempunyai rumus molekul C₁₆H₁₂O₅ dengan bobot molekul 284, maka ion molekul dengan m/z 283 adalah (M-H)⁺ dan ion molekul pada m/z 265 adalah {(M-H)⁺ - H₂O}. Sedang m/z 305 kemungkinan adalah {(m/z 283+Na) - H}.

Ion molekul dengan m/z 149 muncul sebagai *base peak*. Ion molekul ini sangat boleh jadi adalah merupakan fragmen ribosa (BM = 150) (Fragmentasi ribosa tidak dipaparkan). Adanya ion molekul dengan m/z 489 memberikan dugaan bahwa ion tersebut adalah ion induk (M+H)⁺. Berarti bobot molekul senyawa adalah 488. Sehingga munculnya ion molekul pada m/z 511 adalah (M+Na)⁺. Oleh karenanya diduga rumus molekul senyawa flavonoid adalah C₂₄H₂₄O₁₁.

Dari spektrum ¹H-NMR terlihat banyak sekali puncak-puncak resonansi yang menunjukkan bahwa senyawa yang diperoleh belum murni benar, terdapat senyawa pengotor atau senyawa tersebut terdiri lebih dari satu senyawa. Akan tetapi dapat dilihat dengan jelas puncak-puncak resonansi dari molekul ribosa pada δ 3 – 5 ppm, bagian aromatik pada δ 7 – 8 ppm, dan gugus alifatik, metoksi dan

asetil, pada δ 0 – 2 ppm. Berdasarkan perkiraan struktur kimia seperti gambar 12 maka daerah pergeseran kimia yang terekam pada spektrum NMR dapat diringkas seperti pada tabel VI.

Dari data spektra MS dan $^1\text{H-NMR}$ tersebut dapat diperkirakan bahwa struktur kimia senyawa flavonoid seperti tertera pada gambar 12. Adanya gugus gula yang berupa

Hasil uji sintotoksisitas ekstrak etanol, fraksi residu dan bercak kromatogram

Tabel VII. Hasil pengamatan pertumbuhan sel Vero dengan penambahan ekstrak etanol berbagai kadar

Sumuran	Kadar ug/ml											
	27760	13880	6940	3470	1735	868	434	217	108	54	27	14
B	-	-	-	-	-	±	±	±	+	+	+	+
C	-	-	-	-	-	±	±	±	+	+	+	+
D	-	-	-	-	-	±	±	±	+	+	+	+
E	-	-	-	-	-	±	±	±	+	+	+	+
F	-	-	-	-	-	±	±	±	+	+	+	+

Keterangan Tabel VII :

- = pertumbuhan sel Vero dihambat secara sempurna (100 %) oleh ekstrak
- ± = pertumbuhan sel Vero dihambat sebagian (tidak sempurna) oleh ekstrak
- + = pertumbuhan sel Vero tidak dihambat oleh ekstrak etanol

Pengulangan 3 kali menunjukkan hasil yang reliabel

Tabel VIII. Hasil uji penghambatan pertumbuhan sel Vero oleh fraksi residu daun *Gymnora procumbens*

No	Kadar ug/ml											
	32205	16103	8052	4026	2013	1007	504	252	126	63	32	16
1.	-	-	-	-	±	±	±	+	+	+	+	+
2.	-	-	-	-	±	±	±	+	+	+	+	+
3.	-	-	-	-	±	±	±	+	+	+	+	+
4.	-	-	-	-	±	±	±	+	+	+	+	+
5.	-	-	-	-	±	±	±	+	+	+	+	+

Keterangan VIII:

- = pertumbuhan sel Vero dihambat secara sempurna (100 %) oleh ekstrak
- ± = pertumbuhan sel Vero dihambat sebagian (tidak sempurna) oleh ekstrak
- + = pertumbuhan sel Vero tidak dihambat oleh ekstrak etanol

Pengulangan 3 kali menunjukkan hasil yang reliabel

pentosa tidak lazim ditemukan di alam. Oleh sebab itu verifikasi struktur lebih lanjut masih diperlukan.

Fraksi residu adalah ekstrak etanol yang sudah diekstraksi lebih lanjut dengan kloroform dan etil asetat.

Nampak pada tabel VII-VIII bahwa kadar hambat minimum ekstrak etanol daun dan fraksi residu terhadap sel Vero masing-masing sebesar 1735 dan 4026 $\mu\text{g/ml}$. Pada sel meiloma (hasil tidak disajikan), ekstrak etanol kadar 1543 $\mu\text{g/ml}$ baru memberikan penghambatan sebesar 86% sedangkan fraksi residu (ekstrak etanol setelah diekstraksi lanjut dengan pelarut non-polar) mulai kadar 1006 $\mu\text{g/ml}$ memberikan penghambatan sebesar 100%, pada pengamatan selama 96 jam.

Ini berarti bahwa senyawa aktif yang diharapkan tidak larut dalam pelarut non-polar. Ekstraksi dengan pelarut non-polar terhadap ekstrak etanol daun *G. procumbens* dapat meningkatkan toksisitas selektif ekstrak etanol yang diperoleh terhadap sel meiloma.

Uji sitotoksitas bercak kromatogram terhadap sel meiloma dilakukan terhadap bercak A1 dan B1. Dari hasil menunjukkan bahwa baik bercak A1 dan B1 memberikan efek sitotoksitas yang nyata terhadap sel meiloma dan Vero. Terhadap sel meiloma, bercak A1 (flavonoid A1) dan B1 (flavonoid B1) mempunyai harga LC₅₀ masing-masing 5,82 dan 3,40 µM. Terhadap sel Vero masing-masing mempunyai harga LC₅₀ 23,71 dan 10,08 µM. Aktivitas penghambatan pertumbuhan sel mamalia kedua flavonoid ini masih dibawah doksorubisin yang mempunyai LC₅₀ 0,39 dan 0,04 µM masing-masing pada sel Vero dan meiloma. Flavonoid A1 lebih selektif aktif terhadap sel meiloma dibandingkan flavonoid B1 meskipun aktivitasnya lebih lemah dalam menghambat pertumbuhan sel meiloma dibandingkan dengan aktivitas flavonoid B1.

Kesimpulan

Ekstrak etanol daun *Gynura procumbens* dapat menghambat pertumbuhan tumor paru mencit yang diinduksi benzo(a)piren. Fraksi polar ekstrak etanol menunjukkan aktivitas antikarsinogenik sedang fraksi non-polarnya tidak.

Dalam fraksi polar etanol tersebut setidaknya ditemukan tiga flavonoid golongan flavon dan flavonol. Dua dari tiga flavonoid menunjukkan aktivitas penghambatan pertumbuhan sel meiloma dan Vero.

Ucapan Terima kasih

Terima kasih disampaikan kepada Pemerintah Indonesia atas pendanaan penelitian ini lewat Proyek Hibah Bersaing V/III Perguruan tinggi 1998/1999 dan kepada Prof. Yamada, Lab. Biomedical Chemistry, Graduate School of Biotechnology, Osaka University atas fasilitas FAB-MS dan 600 Mhz ¹H-NMR sehingga analisis ini dapat dilaksanakan.

Daftar Pustaka

- Ames, B.M., Mc Cann, J., and Yamasaki, E., 1975, Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella / mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutat. Res.*, **31**, 327.
- Anonim, 1988, *Profil Kesehatan Indonesia*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Pusat data Kesehatan, Jakarta, 14, 36.
- Chu, E.H.Y., 1971, Induction and Analysis of Gene Mutations in Mammalia Cell Cultures, in Hollaender, A. (Ed.) : *Chemical Mutagens : Principles and Methods for Their Detection*, Plenum Press, New York, 411.
- Huang, M.T., Ma, W. Lou., Y.R., Lu., Y.P., Chang, R., Newmark, H. and Conney, A.H., 1995, Inhibitory effect of curcumin on tumorigenesis in mice, *Recent Development in Curcumin Pharmacology : Proceedings of The International Symposium on Curcumin Pharmacology*, August 1995, Yogyakarta, Indonesia, 45.
- Linder, M.C., 1985, Nutrition and Cancer Prevention, dalam Linder, M.C. dan Munro, H.N., (Ed.), *Nutritional Biochemistry and Metabolism*, Elsevier, London, 347-362.
- Markham, K.R., 1988, *Cara Identifikasi Flavonoid*, diterjemahkan oleh Dr. Kosasih Padmawinata, ITB Bandung.
- Kapitulnik, J., Levin, W., Coney, A.H., Yagi, H., Jerina, D.M., 1977, Benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol is More Carcinogenic Than Benzo(a)pyrene in Newborn Mice, *Natural*, 266, 378.
- Sayer, J.M., Whalen, D.L. and Derina, D.M., 1989, Chemical strategies for the inactivation of bay-region diol epoxides, ultimate carcinogens derived from polycyclic aromatic hydrocarbons, *Drug Metabol. Rev.*, **20**, 155.
- Sugiyanto, B., Sudarto, Meiyanto, E., 1993, Efek Penghambatan Karsinogenesis Benzo(a)piren oleh Preparat Tradisional tanaman *Gynura procumbens* dan Identifikasi Awal Senyawa yang Berkhasiat, *Laporan Penelitian*, P4M Ditjen Dikti, Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta.