

**LAPORAN PENELITIAN HIBAH
PENGEMBANGAN KEILMUAN GURU BESAR
TAHUN ANGGARAN 2012**



**HUBUNGAN STRUKTUR TERHADAP AKTIVITAS
ANTIMUTAGENIK BEBERAPA SENYAWA
FLAVANON HASIL ISOLASI RIMPANG TUMBUHAN
KUNCI PEPET (*KAEMPFERIA ROTUNDA*)**

Peneliti :

**Prof. Dr. Sri Atun, M.Si
Prof. Dr. Nurfina Aznam, Apt, SU
Dra. Eddy Sulistyowati, Apt, MS**

Dibiayai oleh DIPA-UNY sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian
Nomor: 063/Subkontrak-Pengembangan Keilmuan Guru Besar /UN34.21/2012

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI YOGYAKARTA**

8 November 2012

HALAMAN PENGESAHAN PROPOSAL PENELITIAN PENGEMBANGAN ILMU GURU BESAR

1. Judul Penelitian

**HUBUNGAN STRUKTUR TERHADAP AKTIVITAS ANTIMUTAGENIK
BEBERAPA SENYAWA FLAVANON HASIL ISOLASI RIMPANG
TUMBUHAN KUNCI PEPET (*KAEMPFERIA ROTUNDA*)**

2. Ketua Peneliti

- a. Nama : Prof. Dr. Sri Atun, M.Si
 b. Jenis Kelamin : Perempuan
 c. NIP : 19651012 199001 2 001
 d. Jabatan Struktural : -
 e. Jabatan Fungsional : Guru Besar
 f. Fakultas/Jurusan : FMIPA/Pendidikan Kimia
 h. Alamat Kantor : Jurdik Kimia, FMIPA UNY, Karangmalang,
 Yogyakarta 55281
 i. Telpon/Faks : (0274) 586168 psw. 215; Fax : (0274) 540713
 j. Alamat Rumah : Soropadan DP III No. 47 CC, Depok, Sleman
 k. Telepon/Faks/ E-mail : Hp 081320318642
 3. Tema Payung Penelitian : Pengembangan Sumber daya alam
 4. Skim Penelitian : LPPM
 5. Program Strategis Nasional : Kesehatan
 6. Bidang Keilmuan/ Penelitian : MIPA-Kimia

7. Anggota Peneliti

No	Nama dan Gelar	Bidang Keahlian
1	Prof. Dr. Nurfina Aznam, Apt, SU,	Farmasi
2	Dra. Eddy Sulistyowati, Apt, MS	Farmasi & Biokimia

4. Mahasiswa yang terlibat

No	Nama	NIM
1	Achmad Ridlo	08307141041
2	Pambudi	08307141003

5. Jangka waktu Penelitian : 1 tahun
 4. Pembiayaan
 a. Jumlah biaya yang diajukan : Rp. 25.000.000,-
 b. Biaya tahun ke 2 dari instansi lain : -

Mengetahui :
Dekan FMIPA UNY

Yogyakarta, 8 November 2012
Ketua Peneliti,

(Dr. Hartono)
NIP. 19620329 198702 1 002

(Prof. Dr. Sri Atun. M.Si)
NIP. 19651012 199001 2 001

Menyetujui :
Ketua LPPM UNY

(Prof. Dr. Anik Ghufroon)
NIP. 19621111 198803 1001

PRAKATA

Dengan mengucapkan syukur Alhamdulillah hirobbil ‘alamin, penulis panjatkan segala puji kehadiran Allah SWT yang senantiasa melimpahkan rahmad dan karuniaNya, yang karena izin-Nya jualah, penulis sampai pada tahap penyelesaian laporan penelitian Hibah Penelitian Guru Besar Tahun anggaran 2012.

Secara khusus penulis ingin menyampaikan penghargaan dan rasa terimakasih kepada berbagai pihak yang telah berperan dalam penyelesaian program ini, kepada :

1. Rektor Universitas Negeri Yogyakarta, yang telah memberi kesempatan dan fasilitas yang diperlukan.
2. Ketua LPPM Universitas Negeri Yogyakarta, yang telah memberi kesempatan dan fasilitas yang diperlukan.
3. Dekan FMIPA Universitas Negeri Yogyakarta yang telah memberi ijin untuk penelitian.
4. Staf LPPT UGM yang telah membantu uji aktivitas.
5. Semua pihak yang telah membantu jalannya penelitian ini hingga selesai.

Mudah-mudahan segala bentuk bantuan yang telah diberikan merupakan amal saleh disisi ALLah SWT, dan semoga laporan ini bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Peneliti

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	
HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN HASIL PENELITIAN	
RINGKASAN DAN SUMMARY	ii
PRAKATA	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
I. PENDAHULUAN	1
II .TINJAUAN PUSTAKA	4
III. METODE PENELITIAN	8
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	13
V. KESIMPULAN DAN SARAN	18
DAFTAR PUSTAKA	19
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

Tabel	Judul Tabel	Halaman
1	Perlakuan Hewan Uji	11
2	Hasil uji aktivitas antimutagenik masing-masing senyawa flavanon	13

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Judul Gambar	Halaman
1	Beberapa senyawa dari rimpang tumbuhan temu giring dan kunci pepet	2
2	Beberapa senyawa kurkuminoid dari rimpang tumbuhan famili Zingiberaceae	5
3	Beberapa senyawa terpenoid dari rimpang tumbuhan Zingiberaceae	6
4	Struktur senyawa kurkumenon dan aerugenon dari temu ireng	7
5	Struktur hasil isolasi senyawa dalam ekstrak metanol kunci pepet	7
6	Grafik % aktivitas antimutagenik senyawa flavanon pada dosis 30 dan 60 mg/kg bb	14
7	Sel eritrosit normal (A) dan sel eritrosit bermikronukleus (B)	14
8	Terbentuknya ikatan hidrogen pada pinostrombin	15
9	Pembentukan kristal pinostrombin yang menunjukkan kelarutan kecil	15
10	Mekanisme siklofosamid mengalkilasi sel	16

ABSTRAK/ RINGKASAN PENELITIAN

Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak metanol kunci pepet, temu giring, temu ireng, dan laos memiliki aktivitas antimutagenik. Persentase aktivitas antimutagenik ekstrak metanol temu giring, kunci pepet, temu ireng, dan laos pada dosis 300 mg/kg bb berturut-turut dari yang paling tinggi adalah 95,6; 81,9; 80; dan 50 %. Dari beberapa ekstrak yang menunjukkan aktivitas tinggi tersebut telah diperoleh beberapa senyawa murni yaitu demetoksikurkumin (0,5 g) dari temu giring, dan tiga senyawa dari kunci pepet, yaitu 4'-hidroksi-8-metoksi-flavanon (1,5 g), 5- hidroksi-7-metoksi-flavanon (5 g), dan 4', 7-dihidroksi-flavanon (1,6 g). Sebagai kelanjutan dari penelitian tersebut perlu dilakukan uji aktivitas antimutagenik terhadap beberapa senyawa hasil isolasi dari kunci pepet yang jumlahnya cukup banyak. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui hubungan struktur dan aktivitas antimutagenik senyawa flavanon yang telah berhasil diisolasi dari rimpang tumbuhan kunci pepet (*Kaempferia rotunda*). Uji aktivitas antimutagenik secara *in vivo* menggunakan mencit jantan galur *Balb-c* berusia 2-3 bulan. Jumlah sel eritrosit polikromatik bermikronukleus (MNPCE) dari mencit akibat induksi senyawa penyebab mutasi (siklofosfamid) dibandingkan terhadap mencit kontrol dan eksperimen. Dosis ekstrak masing-masing sampel yang digunakan adalah 30 dan 60 mg/Kg bb. Persentase aktivitas antimutagenik dari tiga senyawa flavanon yaitu 5- hidroksi-7-metoksiflavanon (A1); 4', 7-dihidroksiflavanon (B1); 4'-hidroksi-7-metoksiflavanon (C1) pada dosis 30 mg/kg bb, masing-masing berturut-turut 56,5%; 93,0%; dan 96,5%. Sedangkan pada dosis 60 mg/kg bb masing-masing menunjukkan aktivitas antimutagenik yang sangat tinggi (lebih dari 95%). Aktivitas antimutagenik dari tiga senyawa flavanon dipengaruhi oleh adanya gugus hidroksil pada posisi 4', karena adanya gugus tersebut meningkatkan kepolaran dari senyawa flavanon.

Kata kunci : antimutagenik; Kaempferia rotunda; kunci pepet; flavanon

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

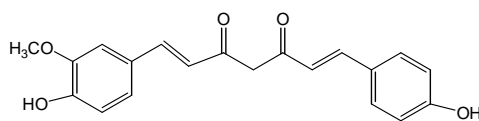
Kanker adalah proses pertumbuhan sel yang tidak terkontrol yang diikuti oleh invasi sel ke jaringan disekitarnya serta penyebaran (metastasis) ke bagian tubuh lain. Sifat utama sel kanker adalah proliferasi terus menerus sehingga menyebabkan ketidakseimbangan antara sel hidup dengan sel mati (Parton *et al*, 2001). Menurut catatan WHO pada tahun 2000 hingga tahun 2010 kanker menempati urutan kedua sebagai penyebab kematian di dunia setelah penyakit jantung dan diperkirakan akan mengalami peningkatan hingga pada tahun 2030 akan menempati urutan pertama. Oleh karena itu, diperlukan pengobatan yang tepat untuk meningkatkan kualitas hidup penderita kanker.

Salah satu faktor yang menyebabkan terjadinya kanker adalah akibat terjadinya mutasi gen pada DNA. Apabila sudah terjadi mutagen pada DNA, maka kanker tersebut menjadi sangat sulit untuk disembuhkan. Hubungan zat-zat mutagen atau karsinogen pada manusia dalam kehidupan sehari-hari dapat terjadi melalui berbagai hal, antara lain : makanan dan minuman, obat-obatan, kosmetika dan perantaraan lingkungan. Mengingat banyaknya paparan zat mutagen atau karsinogen yang mungkin terjadi, perlu adanya upaya untuk mencegah terjadinya paparan tersebut atau dengan menggunakan zat antimutagen atau antikarsinogen. Oleh karena itu perlu dikembangkan bahan dari obat tradisional yang dapat bersifat antimutagen.

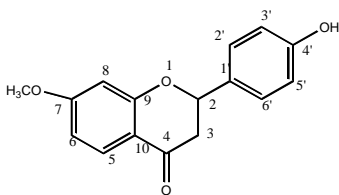
Beberapa tumbuhan yang telah diteliti yang bersifat antimutagenik antara lain *Momordica carantia* (Shumanth M & Chowdary G.N., 2010), asam askorbat (Farghaly, 2009), beberapa senyawa kurkumin dan turunannya (Adam, 2004), Senyawa fenol seperti asam elagat (Smerakh, 2002), ekstrak kunyit, kayumanis, temulawak (Atmawidjaya, 2000). Hasil penelitian Sri Atun (2011) menunjukkan bahwa ekstrak metanol kunci pepet, temu giring, temu ireng, dan laos memiliki aktivitas antimutagenik. Persentase aktivitas antimutagenik ekstrak metanol temu giring, kunci pepet, temu ireng, dan laos pada dosis 300 mg/kg bb berturut-turut dari yang paling tinggi adalah 95,6; 81,9; 80; dan 50 %.

Hasil isolasi dari ekstrak metanol temu giring diperoleh demetoksi kurkumin, sedangkan dari ekstrak metanol kunci pepet diperoleh tiga senyawa yaitu 4'-hidroksi-7-metoksi-flavanon, 5- hidroksi-7-metoksi-flavanon, dan 4', 7-dihidroksi-flavanon masing-masing dalam jumlah yang cukup untuk penelitian lebih lanjut. Oleh karena itu sebagai

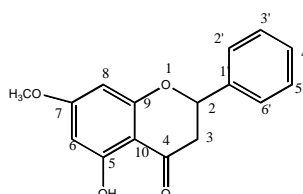
kelanjutan dari penelitian tersebut akan diuji aktivitas antimutagenik dari senyawa-senyawa flavanon hasil isolasi dari kunci pepet (*Kaempferia rotunda*).



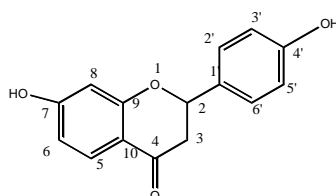
Demetoksikurkumin



4'-hidroksi-7-metoksi-flavanon



5- hidroksi-7-metoksi-flavanon
(Pinostrombin)



4', 7-dihidroksi-flavanon

Gambar 1. Beberapa senyawa dari rimpang tumbuhan temu giring dan kunci pepet

Rumusan permasalahan yang diajukan dari penelitian ini adalah :

- Bagaimana aktivitas antimutagenik dari beberapa senyawa flavanon yang telah diisolasi dari rimpang tumbuhan kunci pepet (*Kaempferia rotunda*)?
- Bagaimanakah hubungan struktur terhadap aktivitas antimutagenik senyawa flavanon hasil isolasi dari rimpang tumbuhan kunci pepet (*Kaempferia rotunda*)?

B. Tujuan Penelitian

Sebagai kelanjutan penelitian, tujuan penelitian ini adalah :

- Menguji aktivitas antimutagenik dari senyawa hasil isolasi dari rimpang tumbuhan kunci pepet (*Kaempferia rotunda*).
- Mengetahui hubungan struktur terhadap aktivitas antimutagenik senyawa hasil isolasi dari rimpang tumbuhan kunci pepet (*Kaempferia rotunda*).

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai dasar dari penelitian lebih lanjut untuk mengembangkan produk yang memiliki nilai jual. Penelitian ini juga memberikan kontribusi bagi pembangunan bangsa, khususnya di bidang kesehatan melalui pemanfaatan tumbuhan lokal. Disamping itu dari penelitian ini diharapkan dapat ditulis dalam jurnal ilmiah nasional maupun internasional, serta dapat diperoleh HAKI. Hasil penelitian tahun sebelumnya telah didaftarkan draf paten dengan judul “Proses pembuatan dan penggunaan ekstrak metanol rimpang tumbuhan Zingiberaceae sebagai antimutagenik”. Selanjutnya apabila penelitian ini berhasil maka dapat dipatenkan juga mengenai “Pemisahan dan penggunaan senyawa flavanon sebagai antimutagenik “. Dampak lebih lanjut dari penelitian ini adalah dapat meningkatkan produktivitas masyarakat untuk menanam tumbuhan yang berkhasiat obat. Manfaat lainnya secara institusional penelitian ini dapat dijadikan sebagai payung penelitian bagi mahasiswa yang akan mengambil skripsi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

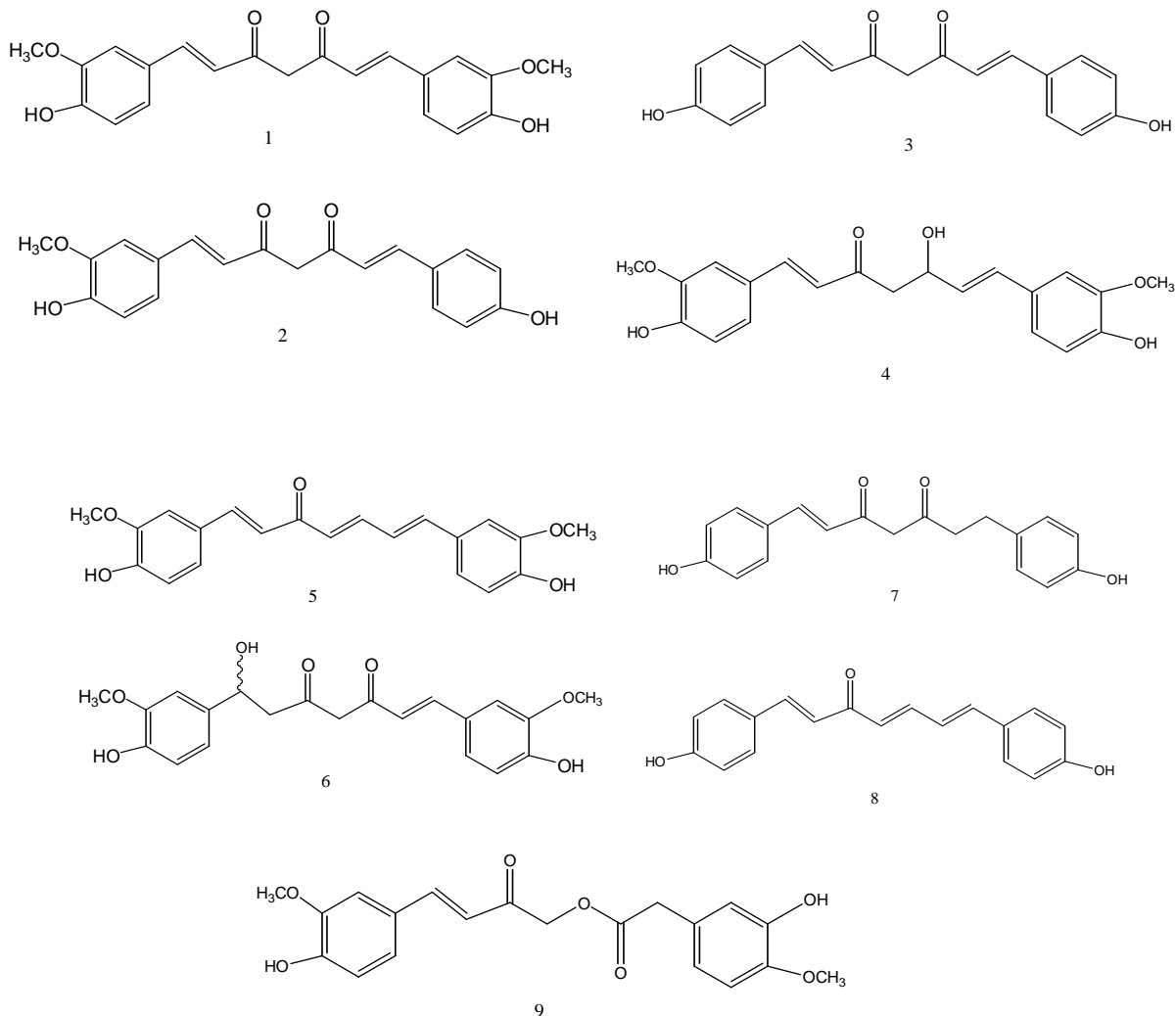
Mutasi merupakan perubahan yang terjadi pada gen atau pada kromosom. Mutasi dapat dikaitkan dengan timbulnya beragam kelainan, termasuk penyakit kanker. Selain dapat terjadi secara spontan, mutasi juga dapat diinduksi oleh berbagai faktor seperti radiasi, senyawa kimia tertentu, dan virus. Banyaknya penggunaan bahan-bahan kimia untuk berbagai keperluan, seperti pengawet maupun obat juga dapat mengakibatkan terjadinya mutasi gen. Faktor-faktor penginduksi mutasi dikenal sebagai mutagen, sedangkan senyawa atau bahan yang dapat digunakan sebagai pencegahnya disebut antimutagenik (Sumanth & Chowdary G.N, 2010).

Salah satu indikator terjadinya mutasi adalah adanya mikronukleus. Mikronukleus merupakan hasil mutasi dari kromosom utuh yang patah dan kemudian tampak sebagai nukleus berukuran kecil di dalam suatu sel. Mikronukleus mudah di amati pada sel polikromatik eritrosit. Jumlah sel eritrosit polikromatik bermikronukleus menunjukkan tingkat kerusakan genetik dalam sistem eritropoietik suatu makhluk hidup (Sumanth & Chowdary G.N, 2010).

Beberapa tumbuhan yang telah diteliti yang bersifat antimutagenik antara lain *Momordica carantia* (Shumanth & Chowdary G.N, 2010), beberapa senyawa kurkumin dan turunannya (Adam, 2004), Senyawa fenol seperti asam elagat (Smerakh, 2002), ekstrak kunyit, kayumanis, temulawak (Atmawidjaya, 2000). Hasil penelitian Sri Atun (2011) menunjukkan bahwa ekstrak metanol kunci pepet, temu giring, temu ireng, dan laos menunjukkan aktivitas antimutagenik. Persentase aktivitas antimutagenik ekstrak metanol berturut-turut dari yang paling tinggi pada dosis 300 mg/kg bb adalah temu giring, kunci pepet, temu ireng, dan laos, dengan aktivitas adalah 95,6; 81,9; 80; dan 50 %.

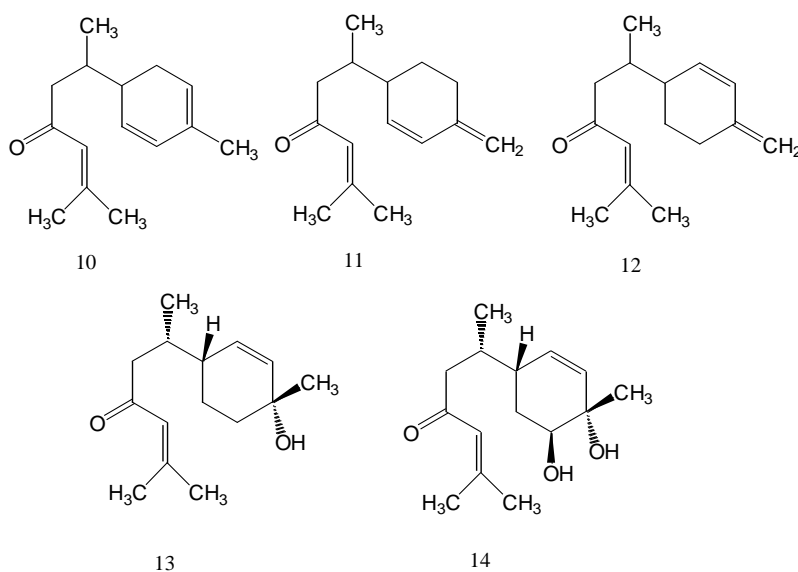
Penelitian kandungan senyawa metabolit sekunder tumbuhan famili Zingiberaceae yang banyak dilaporkan adalah dari tumbuhan *C. domestica*; *C. longa*; *C.anthorrhiza*; *C. zedoaria*, sedangkan *C. hyenana* (temu giring) dan *C. aeruginosa* (temu ireng) belum diteliti secara tuntas (Syamsul A.A, 2007). Dari beberapa tumbuhan *Curcuma* tersebut dilaporkan beberapa spesies yang telah diteliti mengandung senyawa fenol turunan diarilheptanoid dan kurkuminoid dan senyawa seskuiterpen. Beberapa senyawa kurkuminoid yang telah ditemukan pada *C. domestica* dan *C. longa* dapat dilihat pada gambar 2, antara lain kurkumin (1), demetoksikurkumin (2), bis(4-hidroksisinamoil)-metan (3), dihidrokurkumin (4), 1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,4,6-heptatrien-3-on (5), 1-

hidroksi-1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)-6-hepten-3,5-dion (6), 1,7-bis(4-hidroksi-fenil)-1-hepten,3,5-dion (7), 1,7-bis(4-hidroksifenil)-1,4,6-heptatrien-3-on (8), dan calebin A (9) (Park, 2002; Matsuo, 2002).



Gambar 2. Beberapa senyawa kurkuminoid dari rimpang tumbuhan famili Zingiberaceae

Selain senyawa kurkuminoid, dari *C. domestica* juga ditemukan senyawa seskiterpen keton jenis bisabolen seperti pada gambar 3, antara lain α -tumeron (10), β -tumeron (11), kurlon (12), 4-hidroksibisabola-2,10-dien-4-on (13), dan bisakuron (14) (Morikawa, 2002; Wu, 2002; Sjamsul A.A, 2007).

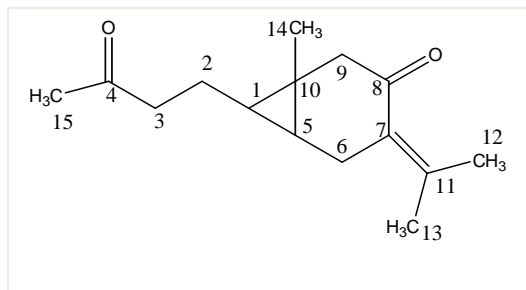


Gambar 3. Beberapa senyawa terpenoid dari rimpang tumbuhan Zingiberaceae

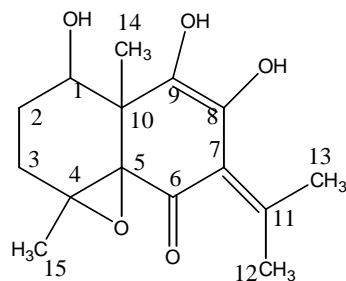
Beberapa penelitian terhadap efek farmakologi senyawa kurkuminoid yang telah ditemukan dari tumbuhan famili Zingiberaceae memperlihatkan aktivitas antioksidan, antiinflamasi, antikarsinogen, dan antifungal. Sedangkan kandungan kimia minyak atsiri tumbuhan ini memperlihatkan sifat-sifat sebagai penolak serangga, antijamur, dan antibakteri (Morikawa, 2002; Wu, 2002; Sjamsul A.A, 2007).

Hasil penelitian Sri Atun (2011) menunjukkan bahwa ekstrak metanol temu giring memiliki aktivitas sitotoksik terhadap beberapa sel kanker seperti *Cervical carcinoma (Ca Ski)*, *Breast carcinoma (MCF-7, Hela S3)* dan *sel payudara T47D*, sedangkan ekstrak metanol temu ireng menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap sel *Cervical carcinoma (Ca Ski)* masing-masing dengan LC_{50} di bawah 100 $\mu\text{g/ml}$. Dari hasil penelitian tersebut juga berhasil diisolasi dua senyawa seskuiterpen dari fraksi kloroform temu ireng yaitu kurkumenon (15) dan senyawa baru yang diberi nama aeruginon (16) (Sri Atun, 2011). Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan adanya beberapa senyawa yang memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker juga menunjukkan sifat antimutagenik (Adam, 2004). Namun sebaliknya, ada juga senyawa yang dapat membunuh sel kanker tetapi pada dosis tinggi bersifat mutagenik atau menyebabkan terjadinya mutasi sel, sebagai contohnya adalah siklofosamid. Oleh karena itu sangat menarik untuk menguji aktivitas antimutagenik pada beberapa ekstrak

maupun senyawa hasil isolasi dari rimpang tumbuhan famili Zingiberaceae yang beberapa diantaranya bersifat sitotoksik.



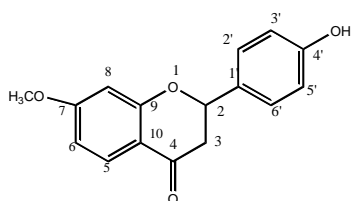
kurkumenon



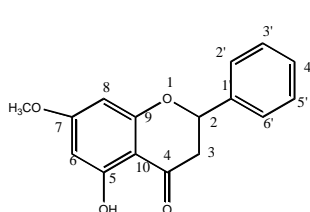
aerugenon

Gambar 4. Struktur senyawa kurkumenon dan aerugenon dari temu ireng

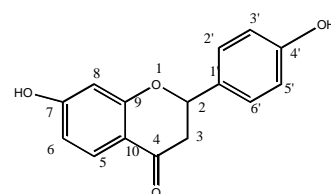
Hasil isolasi, pemurnian, dan identifikasi senyawa dalam fraksi heksan kunci pepet diperoleh satu senyawa, yaitu 5- hidroksi-7-metoksi-flavanon (pinostrombin), dari fraksi kloroform diperoleh dua senyawa yaitu pinostrombin dan 4', 7-dihidroksi-flavanon, sedangkan dari fraksi etil asetat diperoleh tiga senyawa, yaitu 4'-hidroksi-7-metoksi-flavanon, 5- hidroksi-7-metoksi-flavanon, dan 4', 7-dihidroksi-flavanon. Struktur ketiga senyawa tersebut terdapat pada Gambar 5.



4'-hidroksi-7-metoksi-flavanon



5- hidroksi-7-metoksi-flavanon
(pinostrombin)



4', 7-dihidroksi-flavanon

Gambar 5. Struktur hasil isolasi senyawa dalam ekstrak metanol kunci pepet

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini bersifat eksploratif diskriptif, yaitu mengeksplorasi dan menguji aktivitas antimutagenik secara *invivo* beberapa senyawa flavanon hasil isolasi dari rimpang tumbuhan kunci pepet (*Kaempferia rotunda*).

B. Subyek dan Obyek Penelitian

Subyek penelitian ini adalah senyawa flavanon hasil isolasi dari rimpang tumbuhan kunci pepet yang dibeli dari pasar Beringharjo, Daerah Istimewa Yogyakarta, dan diidentifikasi di Fakultas Biologi UGM. Sedangkan obyek penelitian adalah aktivitas antimutageniknya, serta hubungan struktur terhadap aktivitas yang dianalisis secara deskriptif.

C. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam percobaan ini antara lain :

Alat :

- evaporator Buchi Rotavapor R-114
- kandang tikus
- peralatan gelas
- seperangkat alat gelas, seperangkat alat bedah, neraca analitik, satu set alat, pembacaan preparat terdiri dari mikroskop, kamera, dan counter, deskglasser, ependorf, gelas objek
- spektrum ultraviolet (UV) ditentukan dengan Varian Cary 100 Conc
- spektrum inframerah (IR) diperoleh dengan FTIR spektrum ONE Perkin Elmer
- spektrum ^1H dan ^{13}C NMR direkam dengan JEOL JNM A-500 yang dioperasikan pada 500 MHz (^1H) dan 125,65 MHz (^{13}C) dengan menggunakan puncak residu dan pelarut terdeuterasi sebagai standar.
- penguapan pelarut dilakukan pada tekanan rendah menggunakan alat evaporasi Buchi Rotavapor R-114
- kromatografi cair vakum (kcv) untuk fraksinasi dilakukan dengan silika gel Merck 60 GF₂₅₄,

- kromatografi gravitasi (kkg) dilakukan dengan silika gel 60 (35–70 mesh)
- kromatografi kolom tekan (kkt) menggunakan silika gel 60 (230–400 mesh), dan sepadex LH-20
- kromatografi sentrifugal sistem radial (kromatotron) dilakukan dengan silika gel Merck PF₂₅₄ (0,5; 1; dan 2 mm),
- analisis kromatografi lapis tipis (klt) menggunakan plat Si-gel Merck 60 F₂₅₄ 0,25 mm.
- sentrifuge
- *water bath*
- *Shaker bath*

Bahan :

- Na-CMC, siklofosfamid monohidrat (kontrol positif), metanol, xilol, pewarna giemsa, NaCl fisiologis, akuades
- pelarut yang digunakan untuk ekstraksi (etanol, metanol)
- pereaksi penampak noda pada analisis kromatografi lapis tipis digunakan larutan 2% serum sulfat (CeSO₄) dalam asam sulfat.
- pereaksi geser untuk analisis spektrofotometer UV digunakan larutan natrium hidroksida (NaOH) 2 %.
- pelarut yang digunakan antara lain metanol, aseton, *n*-heksan, etil asetat, metilen klorida, kloroform dengan kualitas teknis dan p.a.
- Pakan tikus sesuai standar

Subyek uji

- mencit jantan galur Balb-c yang berusia 2-3 bulan dengan berat badan 22,5-27, 5 g. Selama perlakuan mencit diberi makan berupa pelet 789 dan minuman dari air ledeng yang masing-masing diberikan secara *ad-libitum*

D. Prosedur Kerja

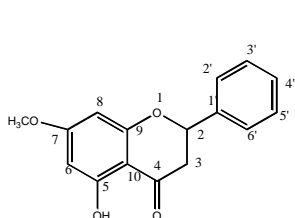
1. Isolasi dan identifikasi struktur kandungan senyawa bioaktif dari ekstrak kunci pepet, untuk menambah jumlah sampel.

Isolasi senyawa kimia dari ekstrak metanol masing-masing rimpang yang menunjukkan aktivitas tinggi dilakukan dengan metode kromatografi. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan pada tekanan rendah dan selanjutnya dipartisi berturut-turut

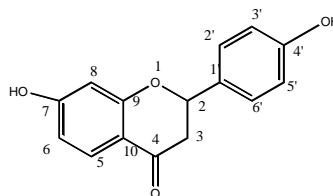
menggunakan pelarut *n*-heksan, kloroform, dan etil asetat. Pemisahan dan pemurnian senyawa kimia yang terdapat pada masing-masing fraksi dilakukan dengan teknik kromatografi, seperti kromatografi vakum cair (kvc), kromatografi kolom gravitasi (kkg), kromatografi kolom tekan (kkt), dan kromatografi sentrifugal (kromatotron), serta kristalisasi untuk senyawa-senyawa yang dapat membentuk kristal. Identifikasi dan elusidasi struktur dilakukan berdasarkan cara yang lazim, dimulai dengan uji kemurnian dengan analisis kromatografi lapis tipis menggunakan beberapa eluen dengan kepolaran berbeda, penentuan titik leleh, serta analisis spektrum UV, IR, ^1H NMR, dan ^{13}C NMR.

2. Uji aktivitas antimutagenik

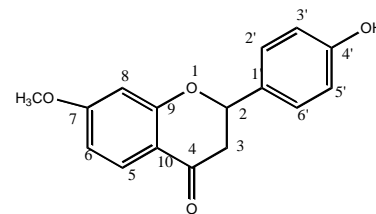
Dalam penelitian ini akan dilakukan uji aktivitas antimutagenik terhadap tiga senyawa flavanon yang telah diketahui struktur molekulnya sebagai berikut:



5- hidroksi-7-metoksi-flavanon
(Pinostrombin) (A)



4', 7-dihidroksi-flavanon
(B)



4'-hidroksi-7-metoksi-flavanon
(C)

Masing-masing senyawa flavanon hasil isolasi dari rimpang kunci pepet yang jumlahnya cukup, selanjutnya diuji aktivitas antimutageniknya secara *invivo* menggunakan mencit jantan galur Balb-c, yang berusia 2-3 bulan dengan berat badan 22,5-27,5 g sebanyak 40 ekor. Hewan uji kemudian dibagi menjadi 8 kelompok perlakuan yang masing-masing terdiri dari 5 ekor mencit. Setiap kelompok mencit ditempatkan dalam kandang plastik yang berbeda dengan alas sekam, dengan suhu ruangan 23-25°C, kelembaban 70 -80% dan cahaya diatur dengan regulator 12 jam terang dan 12 jam gelap. Sebelum perlakuan mencit dipuasakan selama 18 jam, dan saat perlakuan semua mencit diberi makan berupa pelet-789 dan minuman dari air ledeng masing-masing secara *ad-libitum*. Perlakuan terhadap hewan uji terdapat pada tabel 1.

Tabel 1. Perlakuan Hewan Uji

Kelompok	Perlakuan setelah 18 Jam puasa				
	Jam ke -1	30 menit kemudian	24 jam kemudian	30 menit kemudian	6 jam kemudian
I. kontrol	Lar. Na-CMC 1 %	-	Lar. Na-CMC 1 %	-	Dislokasi leher dan pembedahan untuk diambil sumsum tulang paha
II. kontrol positif	Larutan Siklofosfamid dosis 50 mg/kg BB dalam akuades steril	-	Larutan Siklofosfamid dosis 50 mg/kg BB dalam akuades steril	-	
III. Perlakuan (Uji senyawa A1)	Senyawa murni (A) dosis 30 mg/kg BB dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/kg BB dalam akuades steril	Senyawa murni (A) dosis 30 mg/kg BB dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/kg BB dalam akuades steril	
IV. Perlakuan (uji senyawa A2)	Senyawa murni (A) dosis 60 mg/kg BB dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/kg BB dalam akuades steril	Senyawa murni (A) dosis 60 mg/kg BB dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/kg BB dalam akuades steril	
V. Perlakuan (uji senyawa B1)	Senyawa murni (B) dosis 30 mg/kg BB dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/kg BB dalam akuades steril	Senyawa murni (B) dosis 30 mg/kg BB dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/kg BB dalam akuades steril	
VI. Perlakuan (Uji senyawa B2)	Senyawa murni (B) dosis 60 mg/kg BB dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/kg BB dalam akuades steril	Senyawa murni (B) dosis 60 mg/kg BB dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/kg BB dalam akuades steril	
VII. Perlakuan (uji senyawa C1)	Senyawa murni (C) dosis 30 mg/kg BB dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/kg BB dalam akuades steril	Senyawa murni (C) dosis 30 mg/kg BB dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/kg BB dalam akuades steril	
VIII. Perlakuan (Uji senyawa C2)	Senyawa murni (C) dosis 60 mg/kg BB dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/kg BB dalam akuades steril	Senyawa murni (C) dosis 60 mg/kg BB dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/kg BB dalam akuades steril	

Pada hari kedua, tepatnya 6 jam setelah pemberian siklofosamid yang kedua, semua mencit dibunuh dengan cara dislokasi leher, kemudian dibedah untuk diambil kedua tulang pahunya. Sumsum tulang diambil dengan menggunakan spuit yang berisi 1 ml NaCl fisiologis kemudian disentrifugasi pada kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan dibuang dengan menggunakan pipet tetes, sedangkan endapannya digunakan sebagai sediaan sel. Sediaan sel kemudian dibuat preparat apus pada gelas objek, dengan cara meneteskan sediaan sel pada gelas objek kemudian diratakan dengan desckglasser pada derajat kemiringan 45°. Selanjutnya preparat apus dikeringkan pada suhu kamar dan difiksasi dengan metanol absolut selama 10 menit. Setelah kering kemudian dicelupkan dalam larutan pewarna Giemsa 20% selama 30 menit.

Preparat apus setelah terwarnai, kemudian diamati jumlah sel eritrosit polikromatik bermikronukleus (MNPCE) di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali untuk setiap 1000 sel eritrosit polikromatik (PCE). Apabila hasil yang diperoleh dari pengamatan mikroskopik preparat apus kurang jelas, maka preparat difiksasi kembali menggunakan etanol 30, 50, 70 dan 80% serta etanol absolut secara bertingkat masing-masing selama 10 menit. Pada setiap akhir proses fiksasi menggunakan etanol preparat dicuci dengan air mengalir. Sebagai langkah terakhir preparat difiksasi dengan menggunakan xylol selama 10 menit. Kemudian preparat dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan kembali pada suhu kamar. Preparat kemudian diamati kembali di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali untuk setiap 1000 sel eritrosit polikromatik (PCE).

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

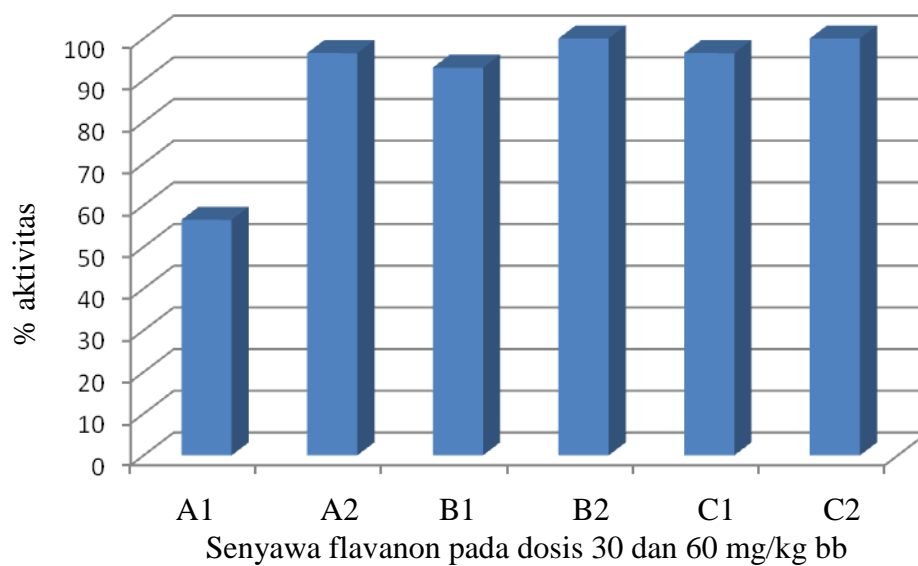
Uji mutagenik masing-masing senyawa flavanon dilakukan dengan perhitungan terbentuknya sel eritrosit polikromatik bermikronukleus (*Micronuclei Polychromatic Cell Erythrocyte* = MNPCE) dari sumsum tulang paha mencit jantan galur *Balb-c* yang berusia 2-3 bulan. Sebagai kontrol positif digunakan siklofosfamid yang merupakan obat kanker yang pada dosis tinggi menyebabkan mutagenik. Dalam penelitian ini juga diamati pengaruh pemberian siklofosfamid diikuti pemberian senyawa flavanon. Hasil analisis data uji mutagenik terdapat pada tabel 2 dan dapat digambarkan dalam bentuk grafik seperti pada Gambar 6.

Persentase aktivitas dari masing-masing ekstrak dihitung menggunakan rumus :

$$\% \text{ aktivitas} = \frac{(\text{rerata}_{\text{kontrol positif}} - (\text{rerata}_{\text{kontrol negatif}} + \text{rerata}_{\text{perlakuan}}))}{\text{rerata}_{\text{kontrol positif}} - (\text{rerata}_{\text{kontrol negatif}})} \times 100\%$$

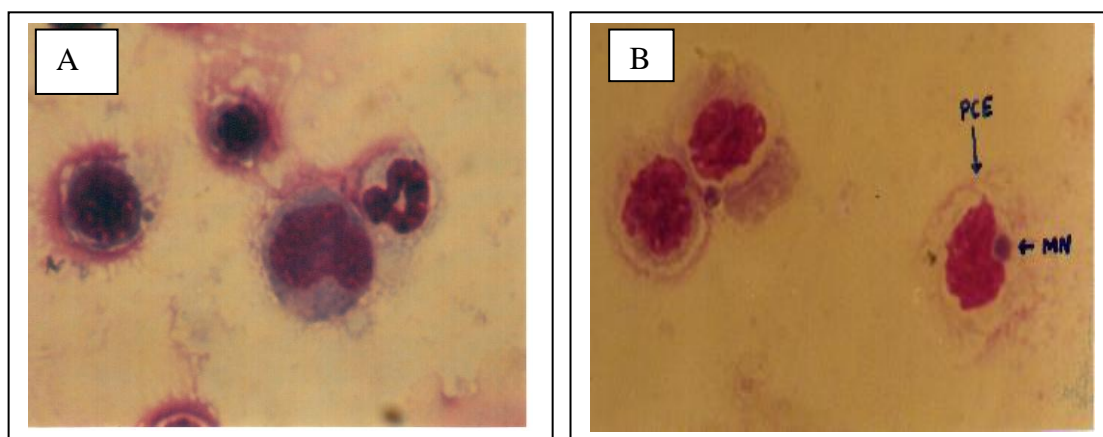
Tabel 2. Hasil uji aktivitas antimutagenik masing-masing senyawa flavanon

No	Perlakuan	Jumlah MNPCE	Mean \pm SD	% aktivitas
1	Kontrol Negatif (Na-CMC 1%)	0; 0; 0;0;0	0,0 \pm 0,0	-
2	Kontrol Positif (Siklofosfamid dosis 50 mg/kg bb	7; 6; 9; 1	5,75 \pm 3,4	-
3	Siklofosfamid 50 mg/kg bb dan senyawa 5- hidroksi-7-metoksiflavanon (A1) dosis 30 mg/kg bb	0;4;6;0	2,5 \pm 3,0	56,5
6	Siklofosfamid 50 mg/kg bb dan senyawa 5- hidroksi-7-metoksiflavanon (A2) dosis 60 mg/kg bb	0;0;0;0;1	0,2 \pm 0,44	96,5
4	Siklofosfamid 50 mg/kg bb dan senyawa 4', 7-dihidroksiflavanon (B1) dosis 30 mg/kg bb	0;0;2;0;0	0,4 \pm 0,89	93,0
7	Siklofosfamid 50 mg/kg bb dan senyawa 4', 7-di-hidroksiflavanon (B2) dosis 60 mg/kg bb	0;0;0;0;0	0,0 \pm 0,0	100
5	Siklofosfamid 50 mg/kg bb dan senyawa 4'-hidroksi-7-metoksiflavanon (C1) dosis 30 mg/kg bb	0; 0; 0;1;0	0,2 \pm 0,44	96,5
8	Siklofosfamid 50 mg/kg bb dan senyawa 4'-hidroksi-7-metoksiflavanon (C2) dosis 60 mg/kg bb	0;0;0;0;0	0,0 \pm 0,0	100



Gambar 6. Grafik % aktivitas antimutagenik senyawa flavanon pada dosis 30 dan 60 mg/kg bb

Bentuk beberapa sel polikromatik dapat ditunjukkan pada Gambar 7 berikut:



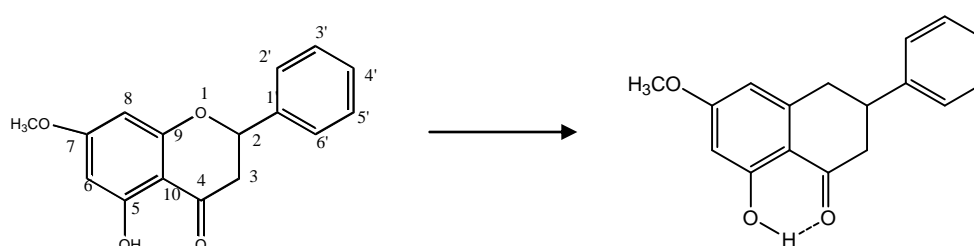
Gambar 7. Sel eritrosit normal (A) dan sel eritrosit bermikronukleus (B)

B. Pembahasan

Dari hasil penelitian ini dapat diketahui adanya perbedaan sifat antimutagenik dari beberapa senyawa flavanon pada dosis 30 mg/kg bb yaitu 5- hidroksi-7-metoksiflavanon (A1); 4', 7-dihidroksiflavanon (B1); 4'-hidroksi-7-metoksiflavanon (C1), masing-masing

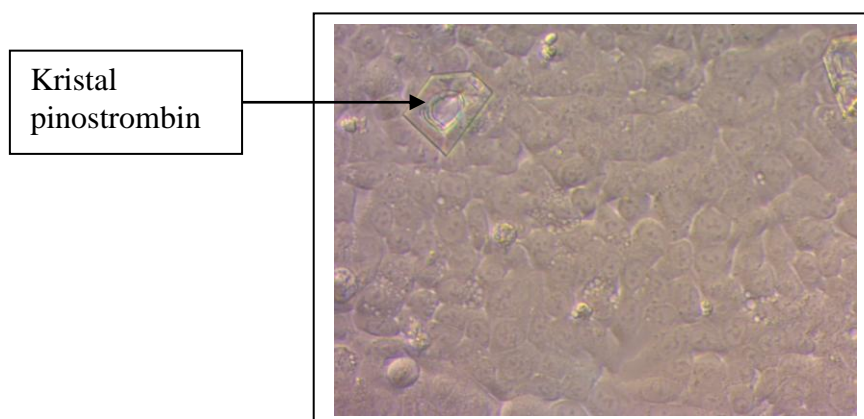
dengan persentase aktivitas 56,5%; 93,0%; dan 96,5%. Sedangkan pada dosis 60 mg/kg bb, ketiga senyawa tersebut menunjukkan aktivitas yang sangat tinggi.

Ditinjau dari struktur molekulnya dapat diketahui bahwa adanya gugus hidroksil pada posisi 4' dapat meningkatkan aktivitas antimutageniknya. Hal tersebut berkaitan dengan sifat polaritas dari kedua senyawa flavanon yang memiliki gugus hidroksil pada posisi 4'. Senyawa 5- hidroksi-7-metoksiflavanon atau pinostrombin tidak memiliki gugus hidroksil pada posisi 4', namun memiliki gugus hidroksil pada posisi 5. Gugus hidroksil pada posisi 5 tersebut tidak bebas, karena dapat membentuk ikatan hidrogen dengan gugus karbonil, seperti ditunjukkan dalam Gambar 8.



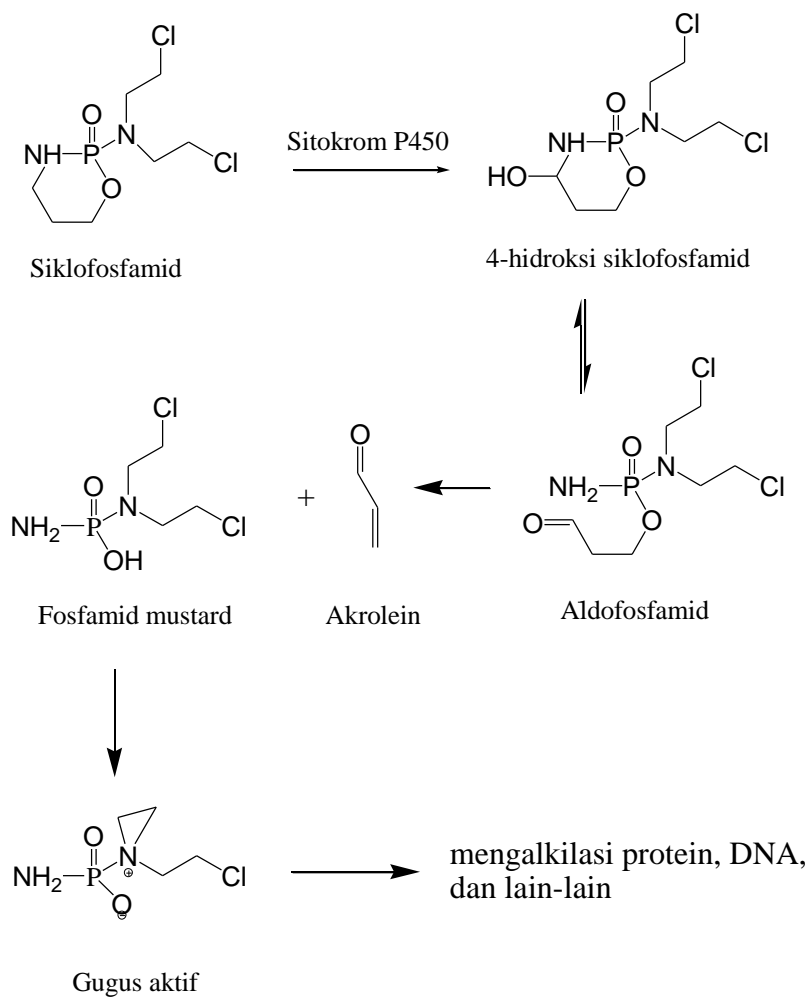
Gambar 8. Terbentuknya ikatan hidrogen pada pinostrombin

Hasil penelitian yang lainnya yaitu uji aktivitas sitotoksik pinostrombin terhadap sel kanker HCT 116 juga menunjukkan adanya butiran kristal pinostrombin yang terbentuk kembali dan terlihat dalam mikroskop *phase kontras* (Gambar 9). Hal ini menunjukkan bahwa pinostrombin memiliki kelarutan yang relatif kecil dibanding senyawa flavanon yang lainnya.



Gambar 9. Pembentukan kristal pinostrombin yang menunjukkan kelarutan kecil

Siklofosfamid sebagai agen alkilasi bekerja lewat timbulnya efek sitotoksik melalui pemindahan gugus alkilnya ke berbagai unsur sel. Alkilasi DNA di dalam nukleus merupakan interaksi utama yang menyebabkan kematian sel. Siklofosfamid diubah oleh isoenzim sitokrom P450 di dalam hati menjadi 4-hidroksi siklofosfamid yang seimbang dengan aldofosfamid. Metabolit-metabolit aktif ini dibawa aliran darah ke jaringan tumor dan jaringan sehat. Selanjutnya terjadi pemecahan nonenzimatis dari aldofosfamid menjadi bentuk sitotoksik fosfamid mustard dan akrolein. Peracunan utama dari alkilator ini adalah pada sumsum tulang (Salmon dan Alan, 1998). Mekanisme siklofosfamid mengalkilasi sel disajikan pada Gambar 10.



Gambar 10. Mekanisme siklofosfamid mengalkilasi sel

Salah satu indikator terjadinya mutasi adalah adanya mikronukleus. Mikronukleus merupakan hasil mutasi dari kromosom yang patah dan kemudian tampak sebagai nukleus berukuran kecil di dalam sel. Mikronukleus mudah diamati pada sel eritrosit polikromatik.

Hal tersebut dikarenakan patah kromosom akan menjadi mikronukleus sesudah sel membelah, sehingga uji mikronukleus dilakukan pada sel yang selalu membelah, misalnya sel pada sumsum tulang. Jumlah sel eritrosit polikromatik bermikronukleus (MNPCE) menunjukkan tingkat kerusakan genetik dalam sistem *eritropoietik* suatu makhluk hidup (Didi J.P. dkk, 2000). Mikronukleus berasal dari fragmen asentrik atau kromosom yang tertinggal pada saat sel melakukan mitosis sebagai hasil kerusakan atau cacat pada perlengkapan benang kromosom, sehingga mikronukleus terbentuk pada stadium anafase.

Terjadinya penurunan jumlah MNPCE ini mungkin disebabkan adanya interaksi antara senyawa flavanoid, yang juga memiliki gugus-gugus aktif seperti hidroksil, sehingga metabolit aktif dari siklofosfamid yang dapat menimbulkan terjadinya mutasi gen dapat dihambat atau melalui mekanisme lain yaitu senyawa flavanoid menghambat isoenzim sitokrom P450, sehingga siklofosfamid tidak reaktif.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Persentase aktivitas antimutagenik dari tiga senyawa flavanon yaitu 5-hidroksi-7-metoksiflavanon (A1); 4', 7-dihidroksiflavanon (B1); 4'-hidroksi-7-metoksiflavanon (C1) pada dosis 30 mg/kg bb, masing-masing dengan prosentase aktivitas 56,5%; 93,0%; dan 96,5%. Sedangkan pada dosis 60 mg/kg bb masing-masing senyawa menunjukkan aktivitas yang sangat tinggi.
2. Aktivitas antimutagenik dari tiga senyawa flavanon dipengaruhi oleh adanya gugus hidroksil pada posisi 4', karena adanya gugus tersebut meningkatkan kepolaran dari senyawa flavanon.

B. Saran

Penelitian ini perlu dilanjutkan untuk melakukan uji aktivitas dengan pengamatan secara molekuler, yaitu dengan melihat perubahan DNA dari subyek uji.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams BK, Ferstl EM, Davis MC, Herold M, Kurtkaya S, Camalier RF, Hollingshead MG, Kaur G, Sausville EA, Rickles FR, (2004). Synthesis and biological evaluation of novel curcumin analogs as anti-cancer and anti-angiogenesis agents. *Bioorg Med Chem.* 12 (14):3871–3883.
- Atmawidjaja S, Sukmadjaja, Asyarie, Elin Herlina, (2000), Uji daya antimutagenik beberapa ekstrak bahan alam secara mikrobiologi, Kongres Ilmiah Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia XII Tahun 2000.
- Didi J.P., Anas Subarnas, Cucu Hadiansyah, dan Supriyatna. (2000). Aktivitas Antimutagenik dan Antioksidan Daun Puspa (*Schima wallichii* Kort). *Cermin Dunia Kedokteran.* No.127.
- Farghaly A. A. and Mona A.M. Abo-Zeid, (2009), Evaluation of the Antimutagenic Effect of Vitamin C against DNA Damage and Cytotoxicity Induced By Trimethyltin in Mice, *Nature and Science*; 7(12).
- Morikawa T, Matsuda H, Ninomiya K, Yoshikawa M, (2002), Medicinal Foodstuff XXIX. Potent protective effect of sesquiterpenes and curcumin from *Zedoria rhizome* on liver injury induced by D-galatosamin/lipopolysaccharide or tumor necrosis factor- α . *Biol. Pharm. Bull.* 25 (5) 627-631.
- Parton, Martina., Dowsett, Mitchel., and Smith, I., (2001), Studies of Apoptosis in Breast Cancer, *BMJ*, 322: 1528-1532
- Salmon, S.E., dan Alan, C.S., (1998). Kemoterapi Kanker. *Dalam: Farmakologi Dasar dan Klinik.* Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran ECG.
- Smerak K, Sestakova H, Polivkova Z, Barta I., Turek B, (2002), Antimutagenic Effect of Ellagic Acid and its Effect on the Immune Response in Mice, *Czech J. Food Sci.* Vol. 20, No. 5: 181–191
- Sumanth M and Chowdary G.N, (2010), Antimutagenic activity of aqueous extract of *momordica charantia*, *Int.J. for Biotech. and Mol. Biol. Res.* Vol. 1(4), pp.42-46
- Sri Atun, Retno Arianingrum, Nurfina Aznam, Sri Nurestri, (2011), Phytochemical study on some *Curcuma* species from Indonesia, Proseding seminar Internasional Natural products 11-15 Juli 2011, Brisbane, Australia.
- Sjamsul A.A; Hakim, E.H, Makmur L., Syah Y.M., Juliawaty L.D., Mujahidin D., (2007), Ilmu Kimia dan Kegunaan Tumbuh-tumbuhan obat Indonesia, Jilid I, Penerbit ITB.
- Wu, Y., Chen, Y., Xu,J., and Lu L. (2002). Anticancer activities of curcumin on human Burkitt's lymphoma, *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 24(4), 348-352.

LAMPIRAN

Deskripsi

METODE PEMISAHAN DAN PENGGUNAAN BEBERAPA SENYAWA FLAVANON SEBAGAI ANTIMUTAGENIK

Bidang Teknik Invensi : Obat-obatan (*Therapeutics*)

Invensi ini berhubungan dengan beberapa senyawa flavanon, seperti 4'-hidroksi-7-metoksi-flavanon, 5-hidroksi-7-metoksi-flavanon, dan 4',7-dihidroksi-flavanon yang dapat diisolasi dari rimpang tumbuhan kunci pepet (*Kaempferia rotunda*), pembuatan dan penggunaan senyawa tersebut sebagai antimutagenik, dan dosis efektif masing-masing senyawa yang menunjukkan aktivitas sebagai antimutagenik.

Latar Belakang Invensi

Kanker adalah proses pertumbuhan sel yang tidak terkontrol yang diikuti oleh invasi sel ke jaringan disekitarnya serta penyebaran (metastasis) ke bagian tubuh lain. Sifat utama sel kanker adalah proliferasi terus menerus sehingga menyebabkan ketidakseimbangan antara sel hidup dengan sel mati (Parton *et al*, 2001). Menurut catatan WHO pada tahun 2000 hingga tahun 2010 kanker menempati urutan kedua sebagai penyebab kematian di dunia setelah penyakit jantung dan diperkirakan akan mengalami peningkatan hingga pada tahun 2030 akan menempati urutan pertama. Oleh karena itu, diperlukan pengobatan yang tepat untuk meningkatkan kualitas hidup penderita kanker.

Salah satu faktor yang menyebabkan terjadinya kanker adalah akibat terjadinya mutasi gen pada DNA. Apabila sudah terjadi mutagen pada DNA, maka kanker tersebut menjadi sangat sulit untuk disembuhkan. Hubungan zat-zat mutagen atau karsinogen pada manusia dalam kehidupan sehari-hari dapat terjadi melalui berbagai hal, antara lain : makanan dan minuman, obat-obatan, kosmetika dan perantaraan lingkungan.

Mengingat banyaknya pemaparan zat mutagen atau karsinogen yang mungkin terjadi, perlu adanya upaya untuk mencegah terjadinya pemaparan tersebut atau dengan menggunakan zat antimutagen atau antikarsinogen. Oleh karena itu perlu dikembangkan bahan dari obat tradisional yang dapat bersifat antimutagen.

Beberapa tumbuhan yang telah diteliti yang bersifat antimutagenik antara lain *Momordica carantia* (Shumanth M & Nagarjuna C., 2010), asam askorbat (Farghaly, 2009), beberapa senyawa kurkumin dan turunannya (Adam, 2004), Senyawa fenol seperti asam elagat (Smerakh, 2002), ekstrak kunyit, kayumanis, temulawak (Atmawidjaya, 2000). Ekstrak metanol dari beberapa rimpang tumbuhan famili Zingiberaceae, seperti kunci pepet (*Kaempferia rotunda*), temu ireng (*Curcuma aeruginosa* Roxb), temu giring (*Curcuma heyneana* Val), dan laos (*Alpinia galanga* Sw), menunjukkan aktivitas mutagenik hingga 90% pada variasi dosis 300 dan 600 mg/kg bb (Sri Atun, 2011). Hasil isolasi dari ekstrak metanol kunci pepet menunjukkan adanya tiga senyawa flavanon, yaitu 4'-hidroksi-7-metoksi-flavanon, 5-hidroksi-7-metoksi-flavanon, dan 4',7-dihidroksi-flavanon, yang masing-masing menunjukkan aktivitas tinggi sebagai antimutagenik.

Isolasi senyawa flavanon dari rimpang tumbuhan kunci pepet dilakukan dengan cara maserasi secara tuntas dengan metanol pada suhu kamar selama 24 jam (3x). Ekstrak yang diperoleh dipekatkan pada tekanan rendah. Pemisahan dan pemurnian senyawa kimia dilakukan dengan teknik kromatografi, seperti kromatografi vakum cair (kvc) dan kromatografi kolom gravitasi (kg). Identifikasi dan elusidasi struktur dilakukan berdasarkan cara yang lazim, dimulai dengan uji kemurnian dengan analisis kromatografi lapis tipis menggunakan beberapa eluen dengan kepolaran berbeda, penentuan titik leleh, dan analisis spektrum UV, IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, satu dan dua dimensi.

Uji antimutagenik dari senyawa flavanon hasil isolasi rimpang tumbuhan kunci pepet dilakukan dengan perhitungan terbentuknya sel eritrosit polikromatik bermikronukleus (MNPCE) dari sumsum tulang paha mencit jantan galur *Balb-c* yang berusia 6 - 7 minggu yang diberi perlakuan dengan pemberian ekstrak dan pemberian siklofosfamid sebagai induksi terjadinya mutagenik. Sebagai kontrol positif digunakan siklofosfamid yang merupakan obat kanker yang pada dosis tinggi menyebabkan mutagenik.

a) Ringkasan Penemuan

Keunggulan dari penelitian ini adalah :

- 1) Metode isolasi beberapa senyawa flavanon dari rimpang tumbuhan kunci pepet (*kaempferia rotunda*), dan identifikasi struktur molekulnya secara spektroskopi.
- 2) Ditemukan tiga senyawa flavanon, yaitu 4'-hidroksi-7-metoksi-flavanon, 5- hidroksi-7-metoksi-flavanon, dan 4', 7-dihidroksi-flavanon.
- 3) Penggunaan beberapa senyawa flavanon dari rimpang tumbuhan kunci pepet (*kaempferia rotunda*) sebagai antimutagenik pada variasi dosis 30 dan 60 mg/kg bb

b) Uraian Gambar

Tidak ada

Uraian Lengkap Penemuan

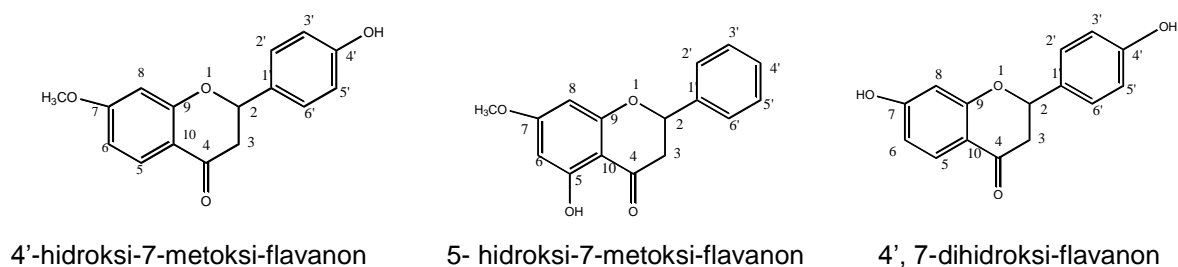
- a. Isolasi dan identifikasi struktur senyawa flavanon dari kunci pepet

Sebanyak 3 kg rimpang kunci pepet yang sudah dicuci, dikeringkan, dan digiling, diekstraksi dengan cara maserasi dengan ditambahkan metanol sebanyak 10 l dan didiamkan pada suhu kamar selama 24 jam, sambil sesekali diaduk. Maserasi ini diulang sebanyak 3x. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan pada tekanan rendah sampai kering, sehingga diperoleh padatan

berwarna kecoklatan. Hasil ekstraksi dari sampel rimpang kunci pepet yang diperoleh sebanyak 230 g.

Ekstrak yang diperoleh dipekatkan pada tekanan rendah dan selanjutnya dipartisi berturut-turut menggunakan pelarut *n*-heksan, kloroform, dan etil asetat. Pemisahan dan pemurnian senyawa kimia yang terdapat pada masing-masing fraksi dilakukan dengan teknik kromatografi, seperti kromatografi vakum cair (kvc), dan kromatografi kolom gravitasi (kg), serta kristalisasi untuk senyawa-senyawa yang dapat membentuk kristal. Identifikasi dan elusidasi struktur dilakukan berdasarkan data spektroskopi, dimulai dengan uji kemurnian dengan analisis kromatografi lapis tipis menggunakan beberapa eluen dengan kepolaran berbeda, penentuan titik leleh, serta analisis spektrum UV, IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, satu dan dua dimensi.

Hasil isolasi, pemurnian, dan identifikasi senyawa dalam fraksi heksan diperoleh satu senyawa, yaitu 5-hidroksi-7-metoksi-flavanon (pinostrombin), dari fraksi kloroform diperoleh dua senyawa yaitu pinostrombin dan 4', 7-dihidroksi-flavanon, sedangkan dari fraksi etil asetat diperoleh tiga senyawa, yaitu 4'-hidroksi-7-metoksi-flavanon, 5- hidroksi-7-metoksi-flavanon, dan 4', 7-dihidroksi-flavanon. Struktur ketiga senyawa tersebut terdapat pada gambar 1.



Gambar 1. Struktur hasil isolasi senyawa dalam ekstrak metanol kunci pepet

Data spektroskopi UV 4'-hidroksi-8-metoksi-flavanon menunjukkan panjang gelombang pada 213 dan 283 nm. IR menunjukkan serapan pada 3452; 1614; 1579; dan 1108 cm^{-1} . Spektroskopi UV 6-hidroksi-8-metoksi-flavanon menunjukkan panjang gelombang pada 213 dan 287 nm. IR menunjukkan serapan pada 3444; 1645; 1621; 1381; 1302; 1158; dan 799 cm^{-1} . Selanjutnya data spektroskopi UV 4', 8-dihidroksi-flavanon menunjukkan serapan pada panjang gelombang 213 dan 248 nm. IR menunjukkan serapan pada 3450; 3093; 1631; 1487; 1302; 1168; dan 1089 cm^{-1} . Data spektroskopi NMR proton dan karbon satu dan dua dimensi dari ketiga senyawa tersebut terdapat pada tabel 1.

Tabel 1. Data spektrokopi NMR proton dan karbon satu dan dua dimensi senyawa hasil isolasi dalam ekstrak metanol kunci pepet

No	4'-hidroksi-8-metoksi-flavanon			6-hidroksi-8-metoksi-flavanon			4', 8-dihidroksi-flavanon		
	δ C ppm	Δ H (Σ H; m; J Hz)	HMBC (H \rightarrow C)	δ ppm C	Δ H (Σ H; m; J Hz)	HMBC	δ C ppm	Δ H (Σ H; m; J Hz)	HMBC
1	-			-					
2	79,80	5,48 (1H, d, 12,6)	C4; C1'; C3	77,45	5,43 (1H, d, 2,8)	C4; C1'; C3	79,47	5,56 (1H, dd, 2,9; 12,6)	C4; C-1'; C3
3	46,48	2,67 (1H, d, br s); 2,97 (1H, d, 12,6)	C4; C2	43,5	3,08 (1H, t,); 2,84 (1H, d)	C4; C2	43,63	2,82 (1H, dd, 2,9; 12,6); 3,18 (1H, dd, 2,9; 12,6)	C4; C2
4	187,84	-	-	195,93	-	-	196,85	-	-
5	129,22	7,37 (1H, d, 8)	C5; C7	164,3	-	C5; C7	129,51	7,42 (1H, d, 8)	C5; C-7
6	96,65	6,15 (1H, d, 8)	C8; C5	95,3	6,06 (1H, br s)	C8; C5	96,96	5,98 (1H, d, 8)	
7	165,06	-		168,3	-		165,33	-	
8	94,23	6,09 (1H, br s)	C10; C5	94,43	6,06 (1H, br s)	C10; C5	95,91	6,01 (1H, br s)	C10; C5
9	163,79	-		163,14	-		164,19	-	
10	106,18	-	-	103,3	-		103,29	-	
1'	140,67	-		138,54	-		140,06	-	
2'	129,47	(1H, d, 8,6)	C1'; C2	126,3	7,43 (1H, br s)	C1'; C2	129,45	7,45 (1H, d, 8,0)	C1'; C2
3'	127,23	(1H, d, 8,6)		129,0	7,42 (1H, brs)		127,32	7,56 (1H, d, 8,0)	
4'	165,60	-		126,3	7,43 (1H, br s)		167,38	-	

5'	127,23	(1H, d, 8,6)		129,0	7,42 (1H, brs)		127,32	7,56 (1H, d, 8,0)	
6'	129,47	(1H, d, 8,6)	C1';C2	126,3	7,43 (1H, brs)		129,45	7,45 (1H, d, 8,0)	
OH	-	9,42		-	12,03			9,63 12,16	
OCH ₃	56,14	3,79		55,85	3,81				

b. Uji aktivitas antimutagenik

Masing-masing senyawa flavanon hasil isolasi dari ekstrak metanol rimpang temu kunci pepet selanjutnya diuji aktivitas antimutageniknya secara *invivo* menggunakan mencit jantan galur Balb-c. Mencit jantan galur Balb-c yang berusia 2-3 bulan dengan berat badan 25,0 - 27,5 g sebanyak 40 ekor. Hewan uji kemudian dibagi menjadi 8 kelompok perlakuan yang masing-masing terdiri dari 5 ekor mencit. Setiap kelompok mencit ditempatkan dalam kandang plastik yang berbeda dengan alas sekam, dengan suhu ruangan 23-25°C, kelembaban 70 -80% dan cahaya diatur dengan regulator 12 jam terang dan 12 jam gelap. Sebelum perlakuan mencit dipuasakan selama 18 jam, dan saat perlakuan semua mencit diberi makan berupa pelet-789 dan minuman dari air ledeng masing-masing secara *ad-libitum*. Perlakuan terhadap hewan uji terdapat pada tabel 2.

Pada hari kedua, tepatnya 6 jam setelah pemberian siklofosfamid yang kedua, semua mencit dibunuh dengan cara dislokasi leher, kemudian dibedah untuk diambil kedua tulang pahunya. Sumsum tulang diambil dengan menggunakan spet yang berisi 1 ml NaCl fisiologis kemudian disentrifugasi pada kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan dibuang dengan menggunakan pipet tetes, sedangkan endapannya digunakan sebagai sediaan sel. Sediaan sel kemudian dibuat preparat apus pada gelas objek, dengan cara meneteskan sediaan sel pada gelas objek kemudian diratakan dengan desckglasser pada derajat kemiringan 45°. Selanjutnya preparat apus dikeringkan pada suhu kamar dan difiksasi dengan metanol absolut selama 10 menit. Setelah kering

kemudian dicelupkan dalam larutan pewarna Giemsa 20% selama 30 menit.

Tabel 2. Perlakuan Hewan Uji

Kelompok	Perlakuan setelah 18 Jam puasa				
	Jam ke -1	30 menit kemudian	24 jam kemudian	30 menit kemudian	6 jam kemudian
I. kontrol	Lar. Na-CMC 1 %	-	Lar. Na-CMC 1 %	-	Dislokasi leher dan pembedahan untuk diambil sumsum tulang paha
II. kontrol positif	Larutan Siklofosfamid dosis 50 mg/kg BB dalam akuades steril	-	Larutan Siklofosfamid dosis 50 mg/kg BB dalam akuades steril	-	
Kelompok perlakuan 1	Senyawa flavanon A pada dosis 30 mg/kg bb dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/ kg BB dalam akuades steril	Senyawa flavanon A pada dosis 30 mg/kg bb dalam Na-CMC 1%	-	
Kelompok perlakuan 2	Senyawa flavanon A pada dosis 60 mg/kg bb dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/ kg BB dalam akuades steril	Senyawa flavanon A pada dosis 60 mg/kg bb dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/ kg BB dalam akuades steril	
Kelompok Perlakuan 3	Senyawa flavanon B pada dosis 30 mg/kg bb dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/ kg BB dalam akuades steril	Senyawa flavanon B pada dosis 30 mg/kg bb dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/ kg BB dalam akuades steril	
Kelompok Perlakuan 4	Senyawa flavanon B pada dosis 60 mg/kg bb dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/ kg BB dalam akuades steril	Senyawa flavanon B pada dosis 60 mg/kg bb dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/ kg BB dalam akuades steril	
Kelompok Perlakuan 5	Senyawa flavanon C pada dosis 30 mg/kg bb dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/ kg BB dalam akuades steril	Senyawa flavanon C pada dosis 30 mg/kg bb dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/ kg BB dalam akuades steril	
Kelompok Perlakuan 6	Senyawa flavanon C pada dosis 60 mg/kg bb dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/ kg BB dalam akuades steril	Senyawa flavanon C pada dosis 60 mg/kg bb dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/ kg BB dalam akuades steril	

Keterangan :

Senyawa flavanon A : 5-hidroksi-7-metoksi-flavanon
 Senyawa flavanon B : 4',7-dihidroksi-flavanon
 Senyawa flavanon C : 4'-hidroksi-7-metoksi-flavanon

Preparat apus setelah terwarnai, kemudian diamati jumlah sel eritrosit polikromatik bermikronukleus (MNPCE) di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali untuk setiap 1000 sel eritrosit polikromatik (PCE). Apabila hasil yang diperoleh dari pengamatan mikroskopik preparat apus kurang jelas, maka preparat difiksasi kembali menggunakan etanol 30, 50, 70 dan 80% serta etanol absolut secara bertingkat masing-masing selama 10 menit. Pada setiap akhir proses fiksasi menggunakan etanol preparat dicuci dengan air mengalir. Sebagai langkah terakhir preparat difiksasi dengan menggunakan xylol selama 10 menit. Kemudian preparat dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan kembali pada suhu kamar. Preparat kemudian diamati kembali di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali untuk setiap 1000 sel eritrosit polikromatik (PCE).

Hasil analisis data uji antimutagenik terdapat pada tabel 3, sedangkan bentuk sel polikromatik seperti terdapat pada gambar 1. Persentase aktivitas dari masing-masing ekstrak dihitung menggunakan rumus :

$$\% \text{ aktivitas} = \frac{(\text{rerata}_{kp} - (\text{rerata}_{kn} + \text{rerata}_{kbs}))}{(\text{rerata}_{kp} - \text{rerata}_{kbs})} \times 100\%$$

Keterangan

kp = kelompok kontrol positif (perlakuan siklofosfamid)

kn = kelompok kontrol perlakuan

kbs = kelompok blanko sampel

Tabel 3. Hasil uji aktivitas antimutagenik masing-masing senyawa flavanon

No	Perlakuan	Jumlah MNPCE	Mean \pm SD	% aktivitas
1	Kontrol Negatif (Na-CMC 1%)	0; 0; 0;0;0	0,0 \pm 0,0	-
2	Kontrol Positif (Siklofosfamid dosis 50 mg/kg bb	7; 6; 9; 1	5,75 \pm 3,4	-
3	Siklofosfamid 50 mg/kg bb dan senyawa A dosis 30 mg/kg bb	0;4;6;0	2,5 \pm 3,0	56,5
4	Siklofosfamid 50 mg/kg bb dan senyawa A dosis 60 mg/kg bb	0;0;0;0;1	0,2 \pm 0,44	96,5
5	Siklofosfamid 50 mg/kg bb dan senyawa B dosis 30 mg/kg bb	0;0;2;0;0	0,4 \pm 0,89	93,0
6	Siklofosfamid 50 mg/kg bb dan senyawa B dosis 60 mg/kg bb	0;0;0;0;0	0,0 \pm 0,0	100
7	Siklofosfamid 50 mg/kg bb dan senyawa C dosis 30 mg/kg bb	0; 0; 0;1;0	0,2 \pm 0,44	96,5
8	Siklofosfamid 50 mg/kg bb dan senyawa C dosis 60 mg/kg bb	0;0;0;0;0	0,0 \pm 0,0	100

Klaim

1. Isolasi senyawa flavanon dari rimpang kunci pepet dilakukan dengan cara cara maserasi dengan penambahan metanol, dilanjutkan dengan pemekatan, dan partisi berturut-turut menggunakan pelarut *n*-heksan, kloroform, dan etil asetat. Pemisahan dan pemurnian senyawa kimia yang terdapat pada masing-masing fraksi dilakukan dengan teknik kromatografi, seperti kromatografi vakum cair (kvc), dan kromatografi kolom gravitasi (kg), serta kristalisasi untuk senyawa-senyawa yang dapat membentuk kristal. Identifikasi dan elusidasi struktur dilakukan berdasarkan data spektroskopi.
2. Hasil isolasi, pemurnian, dan identifikasi senyawa dalam fraksi heksan diperoleh satu senyawa, yaitu 5- hidroksi-7-metoksi-flavanon (pinostrombin), dari fraksi kloroform diperoleh dua senyawa yaitu 5- hidroksi-7-metoksi-flavanon dan 4', 7-dihidroksi-flavanon, sedangkan dari

fraksi etil asetat diperoleh tiga senyawa, yaitu 4'-hidroksi-7-metoksi-flavanon, 5-hidroksi-7-metoksi-flavanon, dan 4', 7-dihidroksi-flavanon.

3. Penggunaan sesuai dengan klaim 1 dimana dosis senyawa flavanon yang digunakan sebagai antimutagenik masing-masing pada variasi dosis 30 dan 60 mg/ kg bb, 5-hidroksi-7-metoksi-flavanon menunjukkan aktivitas 56,5 dan 96,5%, 4',7-dihidroksi-flavanon menunjukkan aktivitas 93,0 dan 100%, 4'-hidroksi-7-metoksi-flavanon menunjukkan aktivitas 96,5 dan 100%.

Abstrak

Telah dilakukan isolasi dan identifikasi struktur senyawa flavanon dari rimpang kunci pepet (*Kaempferia rotunda*) melalui beberapa tahap penelitian sebagai berikut : pembuatan ekstraks rimpang tumbuhan kunci pepet secara maserasi menggunakan pelarut methanol, dilanjutkan dengan pemekatan, dan partisi berturut-turut menggunakan pelarut *n*-heksan, kloroform, dan etil asetat. Pemisahan dan pemurnian senyawa kimia yang terdapat pada masing-masing fraksi dilakukan dengan teknik kromatografi, seperti kromatografi vakum cair (kvc), dan kromatografi kolom gravitasi (kkg), serta kristalisasi untuk senyawa-senyawa yang dapat membentuk kristal. Identifikasi dan elusidasi struktur dilakukan berdasarkan data spektroskopi. Hasil isolasi, pemurnian, dan identifikasi senyawa dalam fraksi heksan diperoleh satu senyawa, yaitu 5- hidroksi-7-metoksi-flavanon (pinostrombin), dari fraksi kloroform diperoleh dua senyawa yaitu pinostrombin dan 4', 7-dihidroksi-flavanon, sedangkan dari fraksi etil asetat diperoleh tiga senyawa, yaitu 4'-hidroksi-7-metoksi-flavanon, 5- hidroksi-7-metoksi-flavanon, dan 4', 7-dihidroksi-flavanon. Uji mutagenik ekstrak metanol dari masing-masing rimpang tumbuhan famili Zingiberaceae dilakukan dengan perhitungan terbentuknya sel eritrosit polikromatik bermikronukleus (MNPCE) dari sumsum tulang paha mencit jantan galur *Balb-c* yang berusia 2-3 bulan yang diberi perlakuan dengan pemberian masing-masing senyawa flavanon. Sebagai kontrol positif digunakan siklofosfamid pada dosis 50 mg/kg bb. Dosis senyawa flavanon yang digunakan sebagai antimutagenik pada variasi 30 dan 60 mg/ kg bb, 5-hidroksi-7-metoksi-flavanon menunjukkan aktivitas 56,5 dan 96,5%, 4',7-dihidroksi-flavanon menunjukkan aktivitas 93,0 dan 100%, 4'-hidroksi-7-metoksi-flavanon menunjukkan aktivitas 96,5 dan 100%.

Daftar Pustaka

- Adams BK, Ferstl EM, Davis MC, Herold M, Kurtkaya S, Camalier RF, Hollingshead MG, Kaur G, Sausville EA, Rickles FR, (2004). Synthesis and biological evaluation of novel curcumin analogs as anti-cancer and anti-angiogenesis agents. *Bioorg Med Chem.* 12 (14):3871-3883.
- Atmawidjaja S, Sukmadjaja, Asyarie, Elin Herlina, (2000), Uji daya antimutagenik beberapa ekstrak bahan alam secara mikrobiologi, Kongres Ilmiah Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia XII Tahun 2000
- Farghaly A. A. and Mona A.M. Abo-Zeid, (2009), Evaluation of the Antimutagenic Effect of Vitamin C against DNA Damage and Cytotoxicity Induced By Trimethyltin in Mice, *Nature and Science*; 7(12).
- Morikawa T, Matsuda H, Ninomiya K, Yoshikawa M, (2002), Medicinal Foodstuff XXIX. Potent protective effect of sesquiterpenes and curcumin from *Zedoria rhizome* on liver injury induced by D-galatosamin/lipopolysaccharide or tumor necrosis factor- α . *Biol. Pharm. Bull.* 25 (5) 627-631.
- Parton, Martina., Dowsett, Mitchel., and Smith, I., (2001), Studies of Apoptosis in Breast Cancer, *BMJ*, 322: 1528-1532
- Smerak K, Sestakova H, Polivkova Z, Barta I., Turek B, (2002), Antimutagenic Effect of Ellagic Acid and its Effect on the Immune Response in Mice, *Czech J. Food Sci.* Vol. 20, No. 5: 181-191
- Sumanth M and Chowdary G.N, (2010), Antimutagenic activity of aqueous extract of *momordica charantia*, *Int.J. for Biotech. and Mol. Biol. Res.* Vol. 1(4), pp.42-46
- Sri Atun, Retno Arianingrum, (2011), Laporan Penelitian Hibah bersaing, LPPM UNY
- Sjamsul A.A; Hakim, E.H, Makmur L., Syah Y.M., Juliawaty L.D., Mujahidin D., (2007), Ilmu Kimia dan Kegunaan Tumbuh-tumbuhan obat Indonesia, Jilid I, Penerbit ITB.
- Wu, Y., Chen, Y., Xu, J., and Lu L. (2002). Anticancer activities of curcumin on human Burkitt's lymphoma, *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 24(4), 348-352.

B. Kelengkapan Administrasi

1. Data Inventor / Pengusul:

a. Ketua/ Peneliti Utama

Nama : Prof. Dr. Sri Atun, M.Si
 Pekerjaan : Dosen
 Alamat : Kantor : Jurusan Pendidikan Kimia FMIPA
 Universitas Negeri Yogyakarta
 Kampus Karangmalang, Depok, Sleman, Yogyakarta
 Rumah : Soropadan DP III No. 47, CC, Depok,
 Slm, Yogyakarta, 55283
 No. telp. Rumah : (0274) 549186; No. Hp.
 81320318642
 e-mail : Atun_1210@yahoo.com

b. Anggota 1

Nama : Prof. Dr. Nurfina Aznam, Apt, SU
 Pekerjaan: Dosen
 Alamat : Kantor : Jurusan Pendidikan Kimia FMIPA
 Universitas Negeri Yogyakarta
 Kampus Karangmalang, Depok, Sleman,
 Yogyakarta
 Rumah : Gowongan Kidul JT III/410
 No. telp. Rumah : (0274) 561451; No. Hp.
 08156878011
 e-mail : finaazn@yahoo.com

c. Anggota 2

Nama : Dra. Eddy Sulistyowati, Apt, MS
 Pekerjaan : Dosen
 Alamat : Kantor : Jurusan Pendidikan Kimia FMIPA
 Universitas Negeri Yogyakarta
 Kampus Karangmalang, Depok, Sleman, Y
 Yogyakarta
 Rumah : Rumah Dinas FT UGM No. 12, Seturan,
 Depok, Slm, Yk
 No. Hp. 811259907

**ARTIKEL HASIL
PENELITIAN HIBAH
PENGEMBANGAN KEILMUAN GURU BESAR
TAHUN ANGGARAN 2012**



**HUBUNGAN STRUKTUR TERHADAP AKTIVITAS
ANTIMUTAGENIK BEBERAPA SENYAWA
FLAVANON HASIL ISOLASI RIMPANG TUMBUHAN
KUNCI PEPET (*KAEMPFERIA ROTUNDA*)**

Peneliti :

**Prof. Dr. Sri Atun, M.Si
Prof. Nurfina Aznam, Apt, SU
Dra. Eddy Sulistyowati, Apt, MS**

Dibiayai oleh DIPA-UNY sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian
Nomor: 063/Subkontrak-Pengembangan Keilmuan Guru Besar /UN34.21/2012

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI YOGYAKARTA**

8 November 2012

AKTIVITAS ANTIMUTAGENIK BEBERAPA SENYAWA FLAVANON HASIL ISOLASI RIMPANG TUMBUHAN KUNCI PEPET (*KAEMPFERIA ROTUNDA*)

Sri Atun, Nurfina Aznam, Eddy Sulistyowati
Jurusan Pendidikan Kimia, FMIPA, Universitas Negeri Yogyakarta
Jl. Colombo No. 1, Sleman, Yogyakarta

ABSTRAK

Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak metanol kunci pepet, temu giring, temu ireng, dan laos memiliki aktivitas antimutagenik. Persentase aktivitas antimutagenik ekstrak metanol temu giring, kunci pepet, temu ireng, dan laos pada dosis 300 mg/kg bb berturut-turut dari yang paling tinggi adalah 95,6; 81,9; 80; dan 50 %. Dari beberapa ekstrak yang menunjukkan aktivitas tinggi tersebut telah diperoleh beberapa senyawa murni yaitu demetoksikurkumin (0,5 g) dari temu giring, dan tiga senyawa dari kunci pepet, yaitu 4'-hidroksi-8-metoksi-flavanon (1,5 g), 5- hidroksi-7-metoksi-flavanon (5 g), dan 4', 7-dihidroksi-flavanon (1,6 g). Sebagai kelanjutan dari penelitian tersebut dilakukan uji aktivitas antimutagenik terhadap beberapa senyawa hasil isolasi dari kunci pepet yang jumlahnya cukup banyak. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui hubungan struktur dan aktivitas antimutagenik senyawa flavanon yang telah berhasil diisolasi dari rimpang tumbuhan kunci pepet (*Kaempferia rotunda*). Uji aktivitas antimutagenik secara *in vivo* menggunakan mencit jantan galur *Balb-c* berusia 2-3 bulan. Jumlah sel eritrosit polikromatik bermikronukleus (MNPCE) dari mencit akibat induksi senyawa penyebab mutasi (siklofosamid) dibandingkan terhadap mencit kontrol dan eksperimen. Dosis ekstrak masing-masing sampel yang digunakan adalah 30 dan 60 mg/Kg bb. Persentase aktivitas antimutagenik dari tiga senyawa flavanon yaitu 5- hidroksi-7-metoksiflavanon (A1); 4', 7-dihidroksiflavanon (B1); 4'-hidroksi-7-metoksiflavanon (C1) pada dosis 30 mg/kg bb, masing-masing berturut-turut 56,5%; 93,0%; dan 96,5%. Sedangkan pada dosis 60 mg/kg bb masing-masing menunjukkan aktivitas antimutagenik yang sangat tinggi (lebih dari 95%). Aktivitas antimutagenik dari tiga senyawa flavanon dipengaruhi oleh adanya gugus hidroksil pada posisi 4', karena adanya gugus tersebut meningkatkan kepolaran dari senyawa flavanon.

Kata kunci : antimutagenik; Kaempferia rotunda; kunci pepet; flavanon

PENDAHULUAN

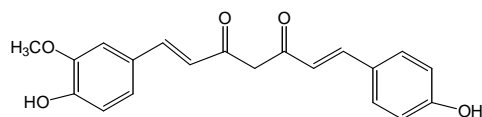
Kanker adalah proses pertumbuhan sel yang tidak terkontrol yang diikuti oleh invasi sel ke jaringan disekitarnya serta penyebaran (metastasis) ke bagian tubuh lain. Sifat utama sel kanker adalah proliferasi terus menerus sehingga menyebabkan ketidakseimbangan antara sel hidup dengan sel mati (Parton *et al*, 2001). Menurut catatan WHO pada tahun 2000 hingga tahun 2010 kanker menempati urutan kedua sebagai penyebab kematian di dunia setelah penyakit jantung dan diperkirakan akan mengalami

peningkatan hingga pada tahun 2030 akan menempati urutan pertama. Oleh karena itu, diperlukan pengobatan yang tepat untuk meningkatkan kualitas hidup penderita kanker.

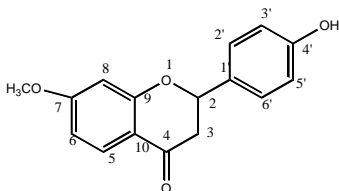
Salah satu faktor yang menyebabkan terjadinya kanker adalah akibat terjadinya mutasi gen pada DNA. Apabila sudah terjadi mutagen pada DNA, maka kanker tersebut menjadi sangat sulit untuk disembuhkan. Hubungan zat-zat mutagen atau karsinogen pada manusia dalam kehidupan sehari-hari dapat terjadi melalui berbagai hal, antara lain : makanan dan minuman, obat-obatan, kosmetika dan perantaraan lingkungan. Mengingat banyaknya pemaparan zat mutagen atau karsinogen yang mungkin terjadi, perlu adanya upaya untuk mencegah terjadinya pemaparan tersebut atau dengan menggunakan zat antimutagen atau antikarsinogen. Oleh karena itu perlu dikembangkan bahan dari obat tradisional yang dapat bersifat antimutagen.

Beberapa tumbuhan yang telah diteliti yang bersifat antimutagenik antara lain *Momordica carantia* (Shumanth M & Chowdary G.N., 2010), asam askorbat (Farghaly, 2009), beberapa senyawa kurkumin dan turunannya (Adam, 2004), Senyawa fenol seperti asam elagat (Smerakh, 2002), ekstrak kunyit, kayumanis, temulawak (Atmawidjaya, 2000). Hasil penelitian Sri Atun (2011) menunjukkan bahwa ekstrak metanol kunci pepet, temu giring, temu ireng, dan laos memiliki aktivitas antimutagenik. Persentase aktivitas antimutagenik ekstrak metanol temu giring, kunci pepet, temu ireng, dan laos pada dosis 300 mg/kg bb berturut-turut dari yang paling tinggi adalah 95,6; 81,9; 80; dan 50 %.

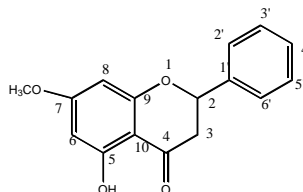
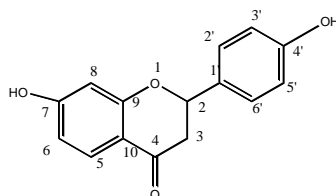
Hasil isolasi dari ekstrak metanol temu giring diperoleh demetoksi kurkumin, sedangkan dari ekstrak metanol kunci pepet diperoleh tiga senyawa yaitu 4'-hidroksi-7-metoksi-flavanon, 5- hidroksi-7-metoksi-flavanon, dan 4', 7-dihidroksi-flavanon masing-masing dalam jumlah yang cukup untuk penelitian lebih lanjut. Oleh karena itu sebagai kelanjutan dari penelitian tersebut akan diuji aktivitas antimutagenik dari senyawa-senyawa flavanon hasil isolasi dari kunci pepet (*Kaempferia rotunda*). Tujuan Penelitian adalah untuk menguji aktivitas antimutagenik dari senyawa hasil isolasi dari rimpang tumbuhan kunci pepet (*Kaempferia rotunda*), serta mengetahui hubungan struktur terhadap aktivitas antimutagenik senyawa hasil isolasi dari rimpang tumbuhan kunci pepet (*Kaempferia rotunda*).



Demetoksikurkumin



4'-hidroksi-7-metoksi-flavanon

5- hidroksi-7-metoksi-flavanon
(Pinostrombin)

4', 7-dihidroksi-flavanon

Gambar 1. Beberapa senyawa dari rimpang tumbuhan temu giring dan kunci pepet

METODE PENELITIAN

Desain Penelitian

Penelitian ini bersifat eksploratif diskriptif, yaitu mengeksplorasi dan menguji aktivitas antimutagenik secara *in vivo* beberapa senyawa flavanon hasil isolasi dari rimpang tumbuhan kunci pepet (*Kaempferia rotunda*).

Subyek dan Obyek Penelitian

Subyek penelitian ini adalah senyawa flavanon hasil isolasi dari rimpang tumbuhan kunci pepet yang dibeli dari pasar Beringharjo, Daerah Istimewa Yogyakarta, dan diidentifikasi di Fakultas Biologi UGM. Sedangkan obyek penelitian adalah aktivitas antimutageniknya, serta hubungan struktur terhadap aktivitas yang dianalisis secara deskriptif.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam percobaan ini antara lain evaporator Buchi Rotavapor R-114, kandang tikus, peralatan gelas, seperangkat alat gelas, seperangkat alat bedah,

neraca analitik, satu set alat, pembacaan preparat terdiri dari mikroskop, kamera, dan counter, deskglasser, endorf, gelas objek, spektrum ultraviolet (UV) ditentukan dengan Varian Cary 100 Conc, spektrum inframerah (IR) diperoleh dengan FTIR spektrum ONE Perkin Elmer, spektrum ^1H dan ^{13}C NMR direkam dengan JEOL JNM A-500 yang dioperasikan pada 500 MHz (^1H) dan 125,65 MHz (^{13}C) dengan menggunakan puncak residu dan pelarut terdeuterasi sebagai standar, penguapan pelarut dilakukan pada tekanan rendah menggunakan alat evaporasi Buchi Rotavapor R-114, kromatografi cair vakum (kcv) untuk fraksinasi dilakukan dengan silika gel Merck 60 GF₂₅₄, kromatografi gravitasi (kkg) dilakukan dengan silika gel 60 (35–70 mesh), kromatografi kolom tekan (kkt) menggunakan silika gel 60 (230–400 mesh), dan kromatografi sentrifugal sistem radial (kromatotron) dilakukan dengan silika gel Merck PF₂₅₄ (0,5; 1; dan 2 mm), analisis kromatografi lapis tipis (klt) menggunakan plat Si-gel Merck 60 F₂₅₄ 0,25 mm, sentrifuge, *water bath*, serta *shaker bath*.

Bahan yang digunakan meliputi Na-CMC, siklofosfamid monohidrat (kontrol positif), metanol, xilol, pewarna giemsa, NaCl fisiologis, akuades, pelarut yang digunakan untuk ekstraksi (etanol, metanol), pereaksi penampak noda pada analisis kromatografi lapis tipis digunakan larutan 2% serum sulfat (CeSO_4) dalam asam sulfat, pereaksi geser untuk analisis spektrofotometer UV digunakan larutan natrium hidroksida (NaOH) 2 %, pelarut yang digunakan antara lain metanol, aseton, *n*-heksan, etil asetat, metilen klorida, kloroform dengan kualitas teknis dan p.a, pakan tikus sesuai standar. Di samping itu sebagai subyek uji dalam penelitian ini adalah mencit jantan galur Balb-c yang berusia 2-3 bulan dengan berat badan 22,5-27, 5 g. Selama perlakuan mencit diberi makan berupa pelet 789 dan minuman dari air ledeng yang masing-masing diberikan secara *ad-libitum*

Prosedur Kerja

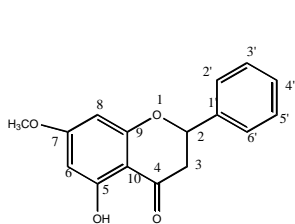
1. Isolasi dan identifikasi struktur kandungan senyawa bioaktif dari ekstrak kunci pepet, untuk menambah jumlah sampel.

Isolasi senyawa kimia dari ekstrak metanol masing-masing rimpang yang menunjukkan aktivitas tinggi dilakukan dengan metode kromatografi. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan pada tekanan rendah dan selanjutnya dipartisi berturut-turut menggunakan pelarut *n*-heksan, kloroform, dan etil asetat. Pemisahan dan pemurnian senyawa kimia yang terdapat pada masing-masing fraksi dilakukan dengan teknik kromatografi, seperti kromatografi vakum cair (kvc), kromatografi kolom gravitasi (kkg),

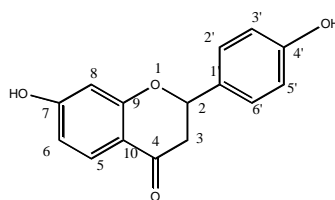
kromatografi kolom tekan (kkt), dan kromatografi sentrifugal (kromatotron), serta kristalisasi untuk senyawa-senyawa yang dapat membentuk kristal. Identifikasi dan elusidasi struktur dilakukan berdasarkan cara yang lazim, dimulai dengan uji kemurnian dengan analisis kromatografi lapis tipis menggunakan beberapa eluen dengan kepolaran berbeda, penentuan titik leleh, serta analisis spektrum UV, IR, ^1H NMR, dan ^{13}C NMR.

2. Uji aktivitas antimutagenik

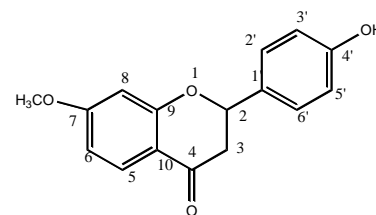
Dalam penelitian ini akan dilakukan uji aktivitas antimutagenik terhadap tiga senyawa flavanon yang telah diketahui struktur molekulnya sebagai berikut:



5- hidroksi-7-metoksi-flavanon
(Pinostrombin) (A)



4', 7-dihidroksi-flavanon
(B)



4'-hidroksi-7-metoksi-flavanon
(C)

Masing-masing senyawa flavanon hasil isolasi dari rimpang kunci pepet yang jumlahnya cukup, selanjutnya diuji aktivitas antimutageniknya secara *in vivo* menggunakan mencit jantan galur Balb-c, yang berusia 2-3 bulan dengan berat badan 22,5-27,5 g sebanyak 40 ekor. Hewan uji kemudian dibagi menjadi 8 kelompok perlakuan yang masing-masing terdiri dari 5 ekor mencit. Setiap kelompok mencit ditempatkan dalam kandang plastik yang berbeda dengan alas sekam, dengan suhu ruangan 23-25°C, kelembaban 70 -80% dan cahaya diatur dengan regulator 12 jam terang dan 12 jam gelap. Sebelum perlakuan mencit dipuasakan selama 18 jam, dan saat perlakuan semua mencit diberi makan berupa pelet-789 dan minuman dari air ledeng masing-masing secara *ad-libitum*. Perlakuan terhadap hewan uji terdapat pada tabel 1.

Tabel 1. Perlakuan Hewan Uji

Kelompok	Perlakuan setelah 18 Jam puasa				
	Jam ke -1	30 menit kemudian	24 jam kemudian	30 menit kemudian	6 jam kemudian
I. kontrol	Lar. Na-CMC 1 %	-	Lar. Na-CMC 1 %	-	Dislokasi leher dan pembedahan untuk diambil sumsum tulang paha
II. kontrol positif	Larutan Siklofosfamid dosis 50 mg/kg BB dalam akuades steril	-	Larutan Siklofosfamid dosis 50 mg/kg BB dalam akuades steril	-	
III. Perlakuan (Uji senyawa A1)	Senyawa murni (A) dosis 30 mg/kg BB dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/kg BB dalam akuades steril	Senyawa murni (A) dosis 30 mg/kg BB dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/kg BB dalam akuades steril	
IV. Perlakuan (uji senyawa A2)	Senyawa murni (A) dosis 60 mg/kg BB dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/kg BB dalam akuades steril	Senyawa murni (A) dosis 60 mg/kg BB dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/kg BB dalam akuades steril	
V. Perlakuan (uji senyawa B1)	Senyawa murni (B) dosis 30 mg/kg BB dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/kg BB dalam akuades steril	Senyawa murni (B) dosis 30 mg/kg BB dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/kg BB dalam akuades steril	
VI. Perlakuan (Uji senyawa B2)	Senyawa murni (B) dosis 60 mg/kg BB dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/kg BB dalam akuades steril	Senyawa murni (B) dosis 60 mg/kg BB dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/kg BB dalam akuades steril	
VII. Perlakuan (uji senyawa C1)	Senyawa murni (C) dosis 30 mg/kg BB dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/kg BB dalam akuades steril	Senyawa murni (C) dosis 30 mg/kg BB dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/kg BB dalam akuades steril	
VIII. Perlakuan (Uji senyawa C2)	Senyawa murni (C) dosis 60 mg/kg BB dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/kg BB dalam akuades steril	Senyawa murni (C) dosis 60 mg/kg BB dalam Na-CMC 1%	Larutan siklofosfamid dosis 50 mg/kg BB dalam akuades steril	

Pada hari kedua, tepatnya 6 jam setelah pemberian siklofosamid yang kedua, semua mencit dibunuh dengan cara dislokasi leher, kemudian dibedah untuk diambil kedua tulang pahnya. Sumsum tulang diambil dengan menggunakan spuit yang berisi 1 ml NaCl fisiologis kemudian disentrifugasi pada kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan dibuang dengan menggunakan pipet tetes, sedangkan endapannya digunakan sebagai sediaan sel. Sediaan sel kemudian dibuat preparat apus pada gelas objek, dengan cara meneteskan sediaan sel pada gelas objek kemudian diratakan dengan desckglasser pada derajat kemiringan 45°. Selanjutnya preparat apus dikeringkan pada suhu kamar dan difiksasi dengan metanol absolut selama 10 menit. Setelah kering kemudian dicelupkan dalam larutan pewarna Giemsa 20% selama 30 menit.

Preparat apus setelah terwarnai, kemudian diamati jumlah sel eritrosit polikromatik bermikronukleus (MNPCE) di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali untuk setiap 1000 sel eritrosit polikromatik (PCE). Apabila hasil yang diperoleh dari pengamatan mikroskopik preparat apus kurang jelas, maka preparat difiksasi kembali menggunakan etanol 30, 50, 70 dan 80% serta etanol absolut secara bertingkat masing-masing selama 10 menit. Pada setiap akhir proses fiksasi menggunakan etanol preparat dicuci dengan air mengalir. Sebagai langkah terakhir preparat difiksasi dengan menggunakan xylol selama 10 menit. Kemudian preparat dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan kembali pada suhu kamar. Preparat kemudian diamati kembali di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali untuk setiap 1000 sel eritrosit polikromatik (PCE).

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

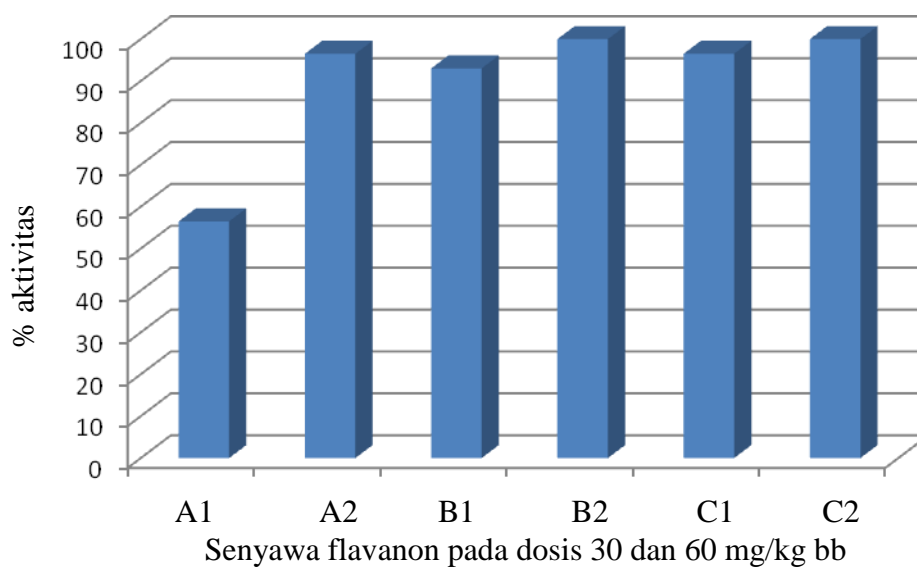
Uji mutagenik masing-masing senyawa flavanon dilakukan dengan perhitungan terbentuknya sel eritrosit polikromatik bermikronukleus (*Micronuclei Polychromatic Cell Erythrocyte* = MNPCE) dari sumsum tulang paha mencit jantan galur *Balb-c* yang berusia 2-3 bulan. Sebagai kontrol positif digunakan siklofosamid yang merupakan obat kanker yang pada dosis tinggi menyebabkan mutagenik. Dalam penelitian ini juga diamati pengaruh pemberian siklofosamid diikuti pemberian senyawa flavanon. Hasil analisis data uji mutagenik terdapat pada tabel 2 dan dapat digambarkan dalam bentuk grafik seperti pada Gambar 2.

Persentase aktivitas dari masing-masing ekstrak dihitung menggunakan rumus :

$$\% \text{ aktivitas} = \frac{(\text{rerata}_{\text{kontrol positif}} - (\text{rerata}_{\text{kontrol negatif}} + \text{rerata}_{\text{perlakuan}}))}{\text{rerata}_{\text{kontrol positif}} - (\text{rerata}_{\text{kontrol negatif}})} \times 100\%$$

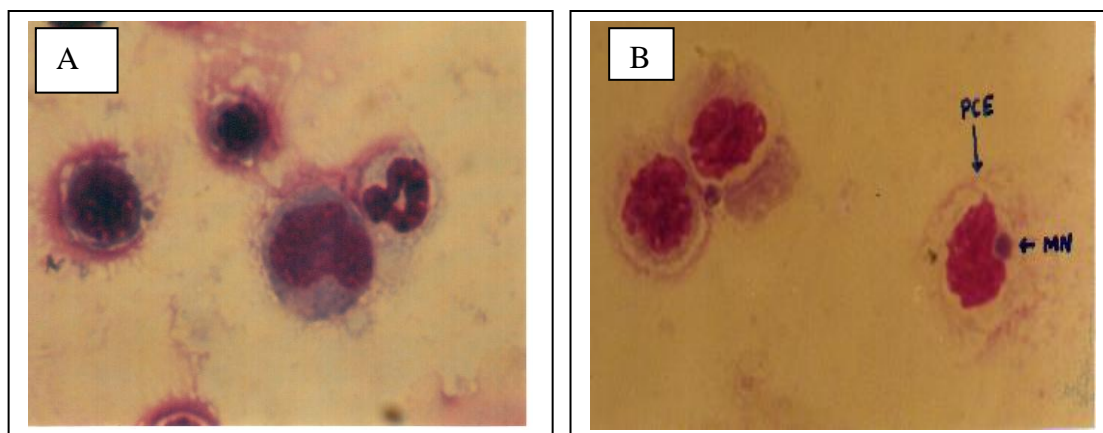
Tabel 2. Hasil uji aktivitas antimutagenik masing-masing senyawa flavanon

No	Perlakuan	Jumlah MNPCE	Mean \pm SD	% aktivitas
1	Kontrol Negatif (Na-CMC 1%)	0; 0; 0;0;0	0,0 \pm 0,0	-
2	Kontrol Positif (Siklofosfamid dosis 50 mg/kg bb	7; 6; 9; 1	5,75 \pm 3,4	-
3	Siklofosfamid 50 mg/kg bb dan senyawa 5- hidroksi-7-metoksiflavanon (A1) dosis 30 mg/kg bb	0;4;6;0	2,5 \pm 3,0	56,5
6	Siklofosfamid 50 mg/kg bb dan senyawa 5- hidroksi-7-metoksiflavanon (A2) dosis 60 mg/kg bb	0;0;0;0;1	0,2 \pm 0,44	96,5
4	Siklofosfamid 50 mg/kg bb dan senyawa 4', 7-dihidroksiflavanon (B1) dosis 30 mg/kg bb	0;0;2;0;0	0,4 \pm 0,89	93,0
7	Siklofosfamid 50 mg/kg bb dan senyawa 4', 7-di-hidroksiflavanon (B2) dosis 60 mg/kg bb	0;0;0;0;0	0,0 \pm 0,0	100
5	Siklofosfamid 50 mg/kg bb dan senyawa 4'-hidroksi-7-metoksiflavanon (C1) dosis 30 mg/kg bb	0; 0; 0;1;0	0,2 \pm 0,44	96,5
8	Siklofosfamid 50 mg/kg bb dan senyawa 4'-hidroksi-7-metoksiflavanon (C2) dosis 60 mg/kg bb	0;0;0;0;0	0,0 \pm 0,0	100



Gambar 2. Grafik % aktivitas antimutagenik senyawa flavanon pada dosis 30 dan 60 mg/kg bb

Bentuk beberapa sel polikromatik dapat ditunjukkan pada Gambar 3 berikut:

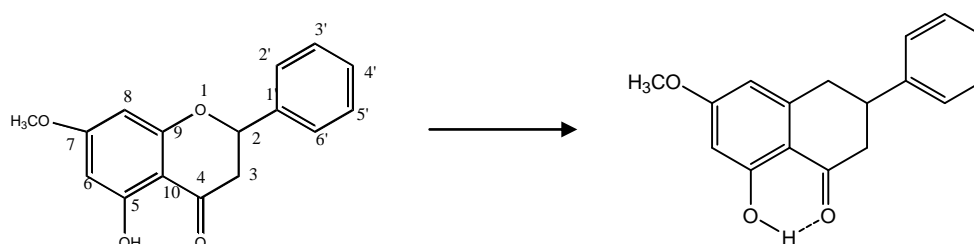


Gambar 3. Sel eritrosit normal (A) dan sel eritrosit bermikronukleus (B)

Pembahasan

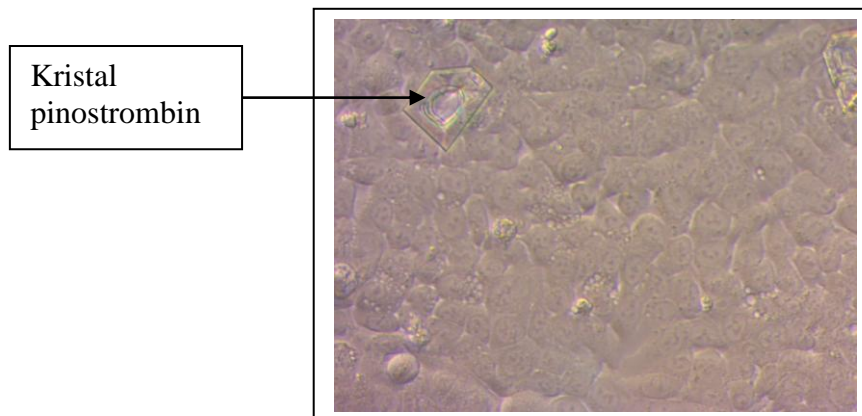
Dari hasil penelitian ini dapat diketahui adanya perbedaan sifat antimutagenik dari beberapa senyawa flavanon pada dosis 30 mg/kg bb yaitu 5- hidroksi-7-metoksiflavanon (A1); 4', 7-dihidroksiflavanon (B1); 4'-hidroksi-7-metoksiflavanon (C1), masing-masing dengan persentase aktivitas 56,5%; 93,0%; dan 96,5%. Sedangkan pada dosis 60 mg/kg bb, ketiga senyawa tersebut menunjukkan aktivitas yang sangat tinggi.

Ditinjau dari struktur molekulnya dapat diketahui bahwa adanya gugus hidroksil pada posisi 4' dapat meningkatkan aktivitas antimutageniknya. Hal tersebut berkaitan dengan sifat polaritas dari kedua senyawa flavanon yang memiliki gugus hidroksil pada posisi 4'. Senyawa 5- hidroksi-7-metoksiflavanon atau pinostrombin tidak memiliki gugus hidroksil pada posisi 4', namun memiliki gugus hidroksil pada posisi 5. Gugus hidroksil pada posisi 5 tersebut tidak bebas, karena dapat membentuk ikatan hidrogen dengan gugus karbonil, seperti ditunjukkan dalam Gambar 4.



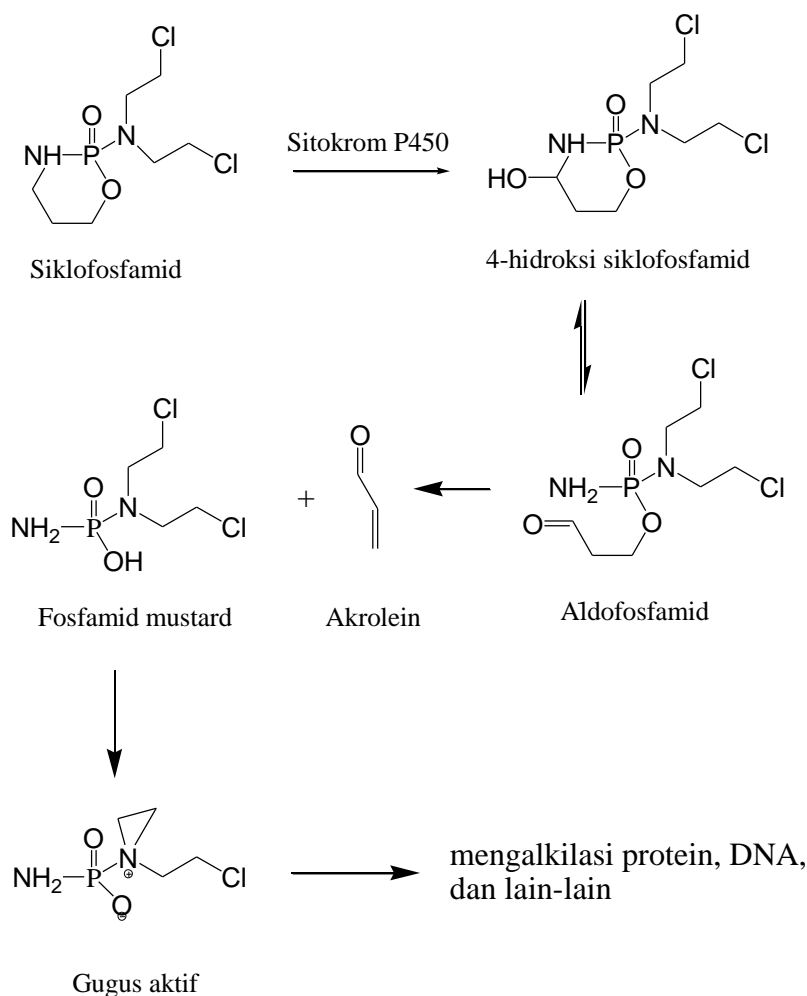
Gambar 4. Terbentuknya ikatan hidrogen pada pinostrombin

Hasil penelitian yang lainnya yaitu uji aktivitas sitotoksik pinostrombin terhadap sel kanker HCT 116 juga menunjukkan adanya butiran kristal pinostrombin yang terbentuk kembali dan terlihat dalam mikroskop *phase contras* (Gambar 5). Hal ini menunjukkan bahwa pinostrombin memiliki kelarutan yang relatif kecil dibanding senyawa flavanon yang lainnya.



Gambar 5. Pembentukan kristal pinostrombin yang menunjukkan kelarutan kecil

Siklofosfamid sebagai agen alkilasi bekerja lewat timbulnya efek sitotoksik melalui pemindahan gugus alkilnya ke berbagai unsur sel. Alkilasi DNA di dalam nukleus merupakan interaksi utama yang menyebabkan kematian sel. Siklofosfamid diubah oleh isoenzim sitokrom P450 di dalam hati menjadi 4-hidroksi siklofosfamid yang seimbang dengan aldofosfamid. Metabolit-metabolit aktif ini dibawa aliran darah ke jaringan tumor dan jaringan sehat. Selanjutnya terjadi pemecahan nonenzimatik dari aldofosfamid menjadi bentuk sitotoksik fosfamid mustard dan akrolein. Peracunan utama dari alkilator ini adalah pada sumsum tulang (Salmon dan Alan, 1998). Mekanisme siklofosfamid mengalkilasi sel disajikan pada Gambar 6.



Gambar 6. Mekanisme siklofosfamid mengalkilasi sel

Salah satu indikator terjadinya mutasi adalah adanya mikronukleus. Mikronukleus merupakan hasil mutasi dari kromosom yang patah dan kemudian tampak sebagai nukleus berukuran kecil di dalam sel. Mikronukleus mudah diamati pada sel eritrosit polikromatik. Hal tersebut dikarenakan patah kromosom akan menjadi mikronukleus sesudah sel membelah, sehingga uji mikronukleus dilakukan pada sel yang selalu membelah, misalnya sel pada sumsum tulang. Jumlah sel eritrosit polikromatik bermikronukleus (MNPCE) menunjukkan tingkat kerusakan genetik dalam sistem *eritropoietik* suatu makhluk hidup (Didi J.P. dkk, 2000). Mikronukleus berasal dari fragmen asentrik atau kromosom yang tertinggal pada saat sel melakukan mitosis sebagai hasil kerusakan atau cacat pada perlengkapan benang kromosom, sehingga mikronukleus terbentuk pada stadium anafase.

Terjadinya penurunan jumlah MNPCE ini mungkin disebabkan adanya interaksi antara senyawa flavanoid, yang juga memiliki gugus-gugus aktif seperti hidroksil, sehingga metabolit aktif dari siklofosfamid yang dapat menimbulkan terjadinya mutasi gen

dapat dihambat atau melalui mekanisme lain yaitu senyawa flavanoid menghambat isoenzim sitokrom P450, sehingga siklofosfamid tidak reaktif.

KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Persentase aktivitas antimutagenik dari tiga senyawa flavanon yaitu 5-hidroksi-7-metoksiflavanon (A1); 4', 7-dihidroksiflavanon (B1); 4'-hidroksi-7-metoksiflavanon (C1) pada dosis 30 mg/kg bb, masing-masing dengan prosentase aktivitas 56,5%; 93,0%; dan 96,5%. Sedangkan pada dosis 60 mg/kg bb masing-masing senyawa menunjukkan aktivitas yang sangat tinggi.
2. Aktivitas antimutagenik dari tiga senyawa flavanon dipengaruhi oleh adanya gugus hidroksil pada posisi 4', karena adanya gugus tersebut meningkatkan kepolaran dari senyawa flavanon.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams BK, Ferstl EM, Davis MC, Herold M, Kurtkaya S, Camalier RF, Hollingshead MG, Kaur G, Sausville EA, Rickles FR, (2004). Synthesis and biological evaluation of novel curcumin analogs as anti-cancer and anti-angiogenesis agents. *Bioorg Med Chem.* 12 (14):3871–3883.
- Atmawidjaja S, Sukmadjaja, Asyarie, Elin Herlina, (2000), Uji daya antimutagenik beberapa ekstrak bahan alam secara mikrobiologi, Kongres Ilmiah Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia XII Tahun 2000.
- Didi J.P., Anas Subarnas, Cucu Hadiansyah, dan Supriyatna. (2000). Aktivitas Antimutagenik dan Antioksidan Daun Puspita (*Schima wallichii* Kort). *Cermin Dunia Kedokteran.* No.127.
- Farghaly A. A. and Mona A.M. Abo-Zeid, (2009), Evaluation of the Antimutagenic Effect of Vitamin C against DNA Damage and Cytotoxicity Induced By Trimethyltin in Mice, *Nature and Science*; 7(12).
- Morikawa T, Matsuda H, Ninomiya K, Yoshikawa M, (2002), Medicinal Foodstuff XXIX. Potent protective effect of sesquiterpenes and curcumin from *Zedoria rhizome* on liver injury induced by D-galatosamin/lipopolysaccharide or tumor necrosis factor- α . *Biol. Pharm. Bull.* 25 (5) 627-631.
- Parton, Martina., Dowsett, Mitchel., and Smith, I., (2001), Studies of Apoptosis in Breast Cancer, *BMJ*, 322: 1528-1532

Salmon, S.E., dan Alan, C.S., (1998). Kemoterapi Kanker. *Dalam: Farmakologi Dasar dan Klinik*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran ECG.

Smerak K, Sestakova H, Polivkova Z, Barta I., Turek B, (2002), Antimutagenic Effect of Ellagic Acid and its Effect on the Immune Response in Mice, *Czech J. Food Sci.* Vol. 20, No. 5: 181–191

Sumanth M and Chowdary G.N, (2010), Antimutagenic activity of aqueous extract of *momordica charantia*, *Int.J. for Biotech. and Mol. Biol. Res.* Vol. 1(4), pp.42-46

Sri Atun, Retno Arianingrum, Nurfina Aznam, Sri Nurestri, (2011), Phytochemical study on some *Curcuma* species from Indonesia, Proseding seminar Internasional Natural products 11-15 Juli 2011, Brisbane, Australia.