



UNIVERSITAS INDONESIA

**SINTESIS DAN UJI SITOTOKSIK SENYAWA DERIVAT
ASAM GALAT TERHADAP SEL KANKER KOLON HCT-116**

TESIS

**AJI HUMAEDI
1406524386**

**FAKULTAS FARMASI
PROGRAM STUDI ILMU KEFARMASIAN
DEPOK
JANUARI 2017**



UNIVERSITAS INDONESIA

**SINTESIS DAN UJI SITOTOKSIK SENYAWA DERIVAT
ASAM GALAT TERHADAP SEL KANKER KOLON HCT-116**

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar magister farmasi

**AJI HUMAEDI
1406524386**

**FAKULTAS FARMASI
PROGRAM STUDI ILMU KEFARMASIAN
DEPOK
JANUARI 2017**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Aji Humaedi

NPM : 1406524386

Tanda Tangan : 

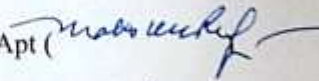


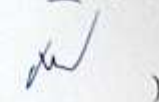

Tanggal : 12 Januari 2017

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :
Nama : Aji Humaedi
NPM : 1406524386
Program Studi : Ilmu Kefarmasian
Judul Tesis : Sintesis dan Uji Sitotoksik Senyawa Derivat Asam Galat
Terhadap Sel Kanker Kolon HCT-116

Telah berhasil dipertahankan dihadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Farmasi pada Program Studi Ilmu Kefarmasian, Fakultas Farmasi Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Prof. Dr. Maksum Radji, M. Biomed., Apt ()
Pembimbing II : Dr. Ade Arsianti, S.Si., M.Si ()
Ketua Sidang : Dr. Anton Bahtiar, M.Biomed., Apt ()
Penguji I : Dr. Hayun, M.Si, Apt ()
Penguji II : Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.S., Apt ()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 12 Januari 2017

HALAMAN PERSEMBAHAN

**Dengan mengucap puji syukur kepada Allah Subhanawata'ala, karya ini
kupersembahkan kepada :**

Abi dan Umi tercinta :

Ayahanda Pepen Ependi dan Ibunda Eneng yang dengan sepenuh hati memberikan dukungan moril maupun materil serta ketulusan do'anya sehingga penelitian dan penyusunan tesis ini dapat terselesaikan dengan baik.

Adik-adikku tercinta :

Deden Ardiansyah dan Balkis Hasbi Muntamar yang telah banyak memberikan motivasi dan semangat juang untuk menyelesaikan jenjang sarjana ini.

Dan saudara-saudaraku yang tidak bisa saya sebutkan satu-persatunya

Semoga kesuksesan selalu menyertai kita

Terima Kasih Atas Do'a dan Motivasinya...

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim

Segala puji bagi Allah Subhanawata'ala karena atas rahmat, taufiq dan hidayahNya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan tesis ini. Hal ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Farmasi pada program Ilmu Kefarnasian Fakultas Farmasi Universitas Indonesia.

Dalam pelaksanaannya, penulis banyak mendapat bantuan, bimbingan, saran, serta dorongan dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Prof. Dr. Maksum Radji, M. Biomed, Apt selaku Dosen Pembimbing I yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penelitian dan penyusunan tesis ini.
2. Dr. Ade Arsianti, S.Si., M.Si selaku Dosen Pembimbing II dan Kepala Laboratorium Departemen Kimia Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia yang telah memberikan kesempatan dalam pelaksanaan penelitian serta menyediakan waktu, tenaga dan arahan dalam penelitian dan penyusunan tesis ini.
3. Dr. Hayun, M.Si., Apt selaku Dosen Penguji I yang telah memberikan kesediaannya untuk menguji serta memberi saran dan kritik yang membangun.
4. Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.S., Apt selaku Dosen Penguji II yang telah memberikan kesediaannya untuk menguji serta memberi saran dan kritik yang membangun.
5. Dr. Anton Bahtiar, M.Biomed., Apt selaku Ketua Sidang yang telah memberikan kesediaannya untuk memimpin sidang tesis ini.
6. Dr. Mahdi Jupri, M.S., Apt selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Indonesia.
7. Prof. Dr. Effionora Anwar, M.S., Apt selaku Ketua Program Pascasarjana Fakultas Farmasi Universitas Indonesia.

8. Bapak dan Ibu dosen serta staf di Program Pascasarjana Fakultas Farmasi Universitas Indonesia.
9. Abi dan umi tercinta yang dengan sepenuh hati memberikan dukungan moril maupun materil serta ketulusan do'anya sehingga penelitian dan penulisan tesis ini dapat terselesaikan dengan baik.
10. Bapak Dr. Ade Sumiardi yang selalu memberikan dukungan do'a dan semangat juang dalam penelitian dan penyusunan tesis.
11. Ibu Juniah, Agus Kurniawan, Putri Yulianti, dan Ibu Eli Sundari yang selalu memberikan dukungan do'a dan semangat juang dalam penelitian dan penyusunan tesis.
12. Sahabat-sahabat seperjuangan di Program Studi Ilmu Kefarmasian Fakultas Farmasi Universitas Indonesia atas do'a, semangat dan kebersamaan selama perkuliahan.
13. Rista Putrianingsih dan Norma Nurazizah, S.Si yang telah banyak membantu dalam penelitian dan penyusunan tesis.
14. Serta semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, yang telah membantu terselesaikannya penelitian dan penyusunan tesis ini.

Semoga segala jasa dan kebaikan semua pihak yang telah diberikan kepada penulis, hanya Allah Subhanawata'ala yang dapat membalasnya.

Dengan segala keterbatasan dan kekurangannya penulis menyadari bahwa penyusunan tesis ini masih jauh dari kesempurnaan. Akhirnya penulis berharap semoga tesis ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan pada umumnya dan ilmu kefarmasian pada khususnya.

Penulis



Aji Humaedi

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Aji Humaedi
NPM : 1406524386
Program Studi : Magister Ilmu Kefarmasian
Peminatan : Kimia Farmasi
Fakultas : Farmasi
Jenis Karya : Tesis

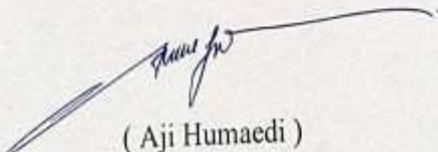
demikian pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul : Sintesis dan Uji Sitotoksik Senyawa Derivat Asam Galat Terhadap Sel Kanker Kolon HCT-116. beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 12 Januari 2017

Yang menyatakan


(Aji Humaedi)

ABSTRAK

Nama : Aji Humaedi
Program Studi : Magister Ilmu Kefarmasian
Judul : Sintesis dan Uji Sitotoksik Senyawa Derivat Asam Galat Terhadap Sel Kanker Kolon HCT-116

Asam galat merupakan senyawa polihidroksifenolik yang mempunyai peran penting dalam berbagai aktivitas selektif terhadap banyak sel *line*. Desain senyawa dengan modifikasi struktur dan mekanisme aksi dari *lead compound* asam galat diharapkan dapat meningkatkan aktivitas baik lipofilisitas maupun aksi sitotoksiknya. Penelitian ini bertujuan untuk mendesain dan memodifikasi struktur asam galat, melakukan simulasi docking, mensintesis, serta melakukan uji aktivitas sitotoksik senyawa derivat asam galat terhadap sel *line* kanker kolon HCT-116. Simulasi docking dilakukan dengan beberapa software adalah is MarvinSketch 15.5.11, Chimera 1.10.2, Autodock 4.2, Pymol 1.7.4.5 dan LigPlot v.1.4.5.; sintesis senyawa derivat asam galat melibatkan beberapa reaksi yaitu esterifikasi, metilasi dan hidrolisis; serta melakukan uji sitotoksik terhadap sel kanker kolon HCT-116. Hasil simulasi docking menghasilkan empat senyawa derivat asam galat dengan nilai *binding energy* terkecil yaitu benzil galat (-7,36 kkal/mol), (2-hidroksi) benzil galat (-7,63 kkal/mol), (4-metoksi-(2-hidroksi) benzil galat (-7,18 kkal/mol) dan feniletil galat (-7,47 kkal/mol). Selanjutnya senyawa derivat asam galat disintesis dan dikarakterisasi menggunakan FT-IR, spektrometer Massa, ¹H NMR dan ¹³C NMR. Sintesis senyawa derivat asam galat menghasilkan rendemen masing-masing adalah 62,11%; 53,25%; 51,05% dan 58,87%. Uji sitotoksik keempat senyawa derivat asam galat memiliki aktivitas penghambatan yang baik terhadap sel *line* kanker kolon HCT-116 dengan nilai IC₅₀ masing-masing adalah 24,79 µg/mL; 21,82 µg/mL; 26,98 µg/mL; dan 19,93 µg/mL. Senyawa terbaik yang memberikan aktivitas penghambatan terhadap sel kanker kolon HCT-116 adalah feniletil galat dengan IC₅₀ sebesar 19,93 µg/mL.

Kata Kunci : asam galat, senyawa derivat asam galat, sintesis, kanker kolon, uji sitotoksik

xv + 87 halaman : 21 gambar + 8 tabel
Daftar pustaka : 100

ABSTRACT

Name : Aji Humaedi
Program Study : Magister of Pharmaceutical sciences
Title : Synthesis and cytotoxic test of gallic acid derivative compound against colon cancer cells HCT-116

Gallic acid is a polyhydroxyphenolic compound that has an important role in a variety of selective activity against many cell line. Design modifications of compounds with structures and mechanisms of action of lead compound gallic acid is expected to increase the activity of both lipophilicity and cytotoxic action. This research aims to design and modify the structure of gallic acid, docking simulation, synthesis, and test the cytotoxic activity of gallic acid derivative compounds against colon cancer cell line HCT-116. Docking simulation performed with some software is MarvinSketch 15.5.11, Chimera 1.10.2, Autodock 4.2, Pymol 1.7.4.5 and LigPlot v.1.4.5. Synthesis of compound gallic acid derivatives which involves several reaction that is esterification, methylation and hydrolysis. As well as to test the cytotoxic against colon cancer cell HCT-116. Docking simulation results produced four compounds gallic acid derivatives with a value of binding energy smallest that is benzyl gallate (-7.36 kcal/mol), (2-hydroxy) benzyl gallate (-7.63 kcal/mol), 4-metoksi-(2-hydroxy), benzyl gallate (-7.18 kcal/mol) and phenylethyl gallate (-7.47 kcal/mol). Further synthesized compound gallic acid derivatives with yield respectively is 62.11%; 53.25% ; 51.05% and 58.87%. Analysis of compound characterization using FT-IR, mass spectrometry, ¹H NMR and ¹³C NMR. Test fourth cytotoxic compound gallic acid derivatives have good inhibitory activity against colon cancer cell line HCT-116 with a value IC₅₀ respectively is 24.79 µg/mL; 21.82 µg/mL; 26.98 µg/mL; and 19.93 µg/ L. Compounds that give the best inhibitory activity against colon cancer cells HCT-116 is phenylethyl gallate with IC₅₀ of 19.93 µg/mL.

Keywords : gallic acid, gallic acid derivatives, synthesis, colon cancer, test cytotoxic

xv + 87 pages : 21 pictures + 8 tables

Bibliography : 100

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xv
1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.4. Manfaat Penelitian	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Asam Galat	5
2.1.1. Nama, Struktur, dan Sifat Fisikokimia Asam Galat	5
2.1.2. Farmakologi Asam Galat	6
2.1.2.1. Absorpsi, Distribusi, dan Ekskresi	6
2.1.2.2. Efek Farmakologi	6
2.1.2.3. Beberapa Target Molekul Asam Galat Sebagai Antikanker	7
2.2. Kanker Kolon	10
2.2.1. Definisi Kanker Kolon	10
2.2.2. Etiologi dan Epidemiologi	10
2.2.3. Patologi	11
2.2.4. Diagnosis dan Terapi	12
2.3. Karsinogenesis Kanker Kolon	13
2.4. Protein BRAF	16

2.4.1. Protein BRAF.....	15
2.4.2. Regulasi Protein BRAF	16
2.4.3. Ekspresi Protein BRAF	17
2.5. Rancangan Obat Berbantu Komputer	18
2.6. Reaksi Esterifikasi, Metilasi, dan Hidrolisis	19
2.6.1. Reaksi Esterifikasi	19
2.6.2. Reaksi Metilasi	21
2.6.3. Reaksi Hidrolisis	22
2.7. Elusidasi dan Karakterisasi Senyawa Hasil Sintesis	22
2.7.1. Kromatografi Lapis Tipis	22
2.7.2. Spektroskopi Inframerah	23
2.7.3. Spektroskopi Massa	23
2.7.4. Spektroskopi Resonansi Magnetik Inti	24
2.8. Uji Sitotoksisitas	25
3. METODE PENELITIAN	27
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian	27
3.2. Alat	27
3.3. Bahan	27
3.4. Desain Dua Puluh Senyawa Derivat Asam Galat	28
3.5. Cara Kerja	29
3.5.1. Simulasi <i>Docking</i>	29
3.5.2. Jalur dan Prosedur Sintesis Derivat Asam Galat	30
3.5.2.1. Jalur dan Prosedur Umum Sintesis Derivat Alkil Ester Galat (Senyawa 2, 4, 1, 3 dan 5)	30
3.5.2.2. Jalur dan Prosedur Umum Sintesis Derivat Alkil Ester Galat Dan Senyawa Antara (Senyawa 6 dan 8-9).....	32
3.5.3. Prosedur Karakterisasi Senyawa Hasil Sintesis	33
3.5.4. Uji Sitotoksisitas Dengan Metode MTT	34
3.6. Bagan Alir Penelitian	35
3.6.1. Simulasi <i>Docking</i>	35
3.6.2. Sintesis Derivat Asam Galat Dengan Esterifikasi	36
3.6.3. Sintesis Derivat Asam Galat Dengan Metilasi	37

3.6.4. Sintesis Derivat Asam Galat Dengan Hidrolisis	38
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	39
4.1. Hasil Simulasi Docking	39
4.2. Karakterisasi Senyawa Derivat Asam Galat	44
4.2.1. Senyawa Sintesis Etil Galat	44
4.2.2. Senyawa Sintesis Benzil Galat	46
4.2.3. Senyawa Sintesis 2-Hidroksi Benzil Galat	48
4.2.4. Senyawa Sintesis 4-Metoksi-2-Hidroksi Benzil Galat	50
4.2.5. Senyawa Sintesis Feniletal Galat	52
4.3. Hasil Uji Sitotoksitas Dengan Metode MTT	54
5. KESIMPULAM DAN SARAN.....	57
DAFTAR ACUAN	58
LAMPIRAN-LAMPIRAN	68

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur 2D Asam Galat	5
Gambar 2.2 Mekanisme Aksi Asam Galat Sebagai Antikanker	10
Gambar 2.3 Karsinogenesis Kanker Kolon	14
Gambar 2.4 Jalur Ras/Raf/MEK/ERK	17
Gambar 2.5 Skema Umum Esterifikasi Steglich	19
Gambar 2.6 Mekanisme Reaksi Esterifikasi Steglich	20
Gambar 2.7 Struktur Kimia DIC	20
Gambar 2.8 Struktur Kimia DMAP	21
Gambar 2.9 Reaksi O-metilasi pada Asam Karboksilat	21
Gambar 2.10 Reaksi O-metilasi Fenol	22
Gambar 2.11 Mekanisme Reaksi Hidrolisis dengan Katalis Basa	22
Gambar 3.1 Desain Dua Puluh Senyawa Derivat Asam Galat	29
Gambar 3.2 Jalur Sintesis Senyawa Derivat Asam Galat 2, 4 dan 15	31
Gambar 3.3 Jalur Sintesis Senyawa 3 (produk utama) dan 5 (produk samping)	31
Gambar 3.4 Jalur Sintesis Derivat Alkil Ester Galat (Senyawa 6) dan Senyawa Antara (Senyawa 8-9)	33
Gambar 3.5 Skema Simulasi Docking	35
Gambar 3.6 Skema Sintesis Senyawa Derivat Asam Galat dengan Esterifikasi	36
Gambar 3.7 Skema Sintesis Senyawa Derivat Asam Galat dengan Metilasi	37
Gambar 3.8 Skema Sintesis Senyawa Derivat Asam Galat dengan Hidrolisis Produk Metilasi Sebelumnya	38
Gambar 4.1 Interaksi BRAF dengan asam galat, derivatnya, serta ligan pembanding; a) asam galat, (b) etil galat, (c) benzil galat, (d) 2-hidroksi benzil galat, (e) 4-metoksi (2-hidroksi) benzil galat, (f) feniletil galat, dan (g) cetuximab	43
Gambar 4.2 Struktur Etil Galat	45
Gambar 4.3 Struktur Benzil Galat	47
Gambar 4.4 Struktur 2-Hidroksi Galat	49
Gambar 4.5 Struktur 4-metoksi-2-hidroksi Benzil Galat	51

Gambar 4.6 Struktur Feniletil Galat	53
Gambar 4.7 Grafik IC ₅₀ Asam Galat, Derivatnya dan Cetuximab pada Sel HCT-116.....	53

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Nama, Struktur, dan Sifat Fisiko Kimia Asam Galat	5
Tabel 4.1. Nilai Energi Gibbs (kkal/mol) Asam Galat, Derivatnya dan Cetuximab	39
Tabel 4.2. Hasil Simulasi docking ligan uji dan ligan pembanding pada BRAF 40	
Tabel 4.3 Hasil analisis Spektrum ^1H NMR dan ^{13}C NMR Senyawa Etil Galat (Lampiran 1)	45
Tabel 4.4 Hasil analisis Spektrum ^1H NMR dan ^{13}C NMR Senyawa Benzil Galat (Lampiran 2)	47
Tabel 4.5 Hasil analisis Spektrum ^1H NMR dan ^{13}C NMR Senyawa 2-Hidroksi Benzil Galat (Lampiran 3)	49
Tabel 4.6 Hasil analisis Spektrum ^1H NMR dan ^{13}C NMR Senyawa 4-Metoksi-2-Hidroksi Benzil Galat (Lampiran 4)	51
Tabel 4.7 Hasil analisis Spektrum ^1H NMR dan ^{13}C NMR Senyawa Feniletal Galat (Lampiran 5)	53

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kanker kolon adalah penyakit kanker yang terjadi di dalam atau permukaan usus besar. Data menunjukkan secara global, bahwa jenis penyakit ini menempati urutan ketiga sebagai kanker yang sering terdiagnosis yang diperkirakan terdapat 1.361 kasus baru dengan jumlah kematian diperkirakan sebesar 694 kematian (Ferlay *et al*, 2015). Pada tahun 2008 diseluruh dunia terdapat lebih dari 1 juta insiden kanker kolon dengan tingkat mortalitas lebih dari 50% (Jemal *et al*, 2011). Berdasarkan data dari Direktorat Jenderal Pelayanan Medik Departemen Kesehatan RI (2005), kasus kanker kolon di rumah sakit se-Indonesia adalah 3.806 kasus dengan proporsi 8,2% dan tahun 2006 adalah 3.442 kasus dengan proporsi 8,11% dari seluruh penyakit kanker. Di Indonesia, data dari Rumah Sakit Darmas Jakarta menunjukkan terdapat sekitar 600 kejadian kanker kolon pada kurun waktu 1994- 2006 (Kastomo, 2007). Sedangkan pada tahun 2012 di Indonesia, diperkirakan terdapat 27.772 kasus dengan angka kematian diperkirakan sebanyak 18.398 kematian (Ferlay *et al*, 2015). Tingginya angka kejadian kanker kolon di Indonesia berhubungan erat dengan salah satu faktor risiko, yaitu gaya hidup seperti pola makan, berat badan, diet dan aktivitas fisik.

Asam galat (*3,4,5-trihydroxyl-benzoic acid*) merupakan senyawa polihidroksifenolik yang dapat ditemukan pada beberapa produk alami seperti teh hijau, anggur, stroberi, pisang (Sun *et al*, 2002) dan mahkota dewa (Faried *et al*, 2007). *Gallnuts*, sumac, kulit kayu ek putih, pisang, lemon, *witch hazel*, anggur merah dan putih, serta kulit apel diketahui kaya akan asam galat (Chu *et al.*, 2002; Wolfe *et al.*, 2003). Asam galat (AG) diabsorpsi dengan sangat baik pada manusia (Shahrzad *et al.*, 2001; Manach *et al.*, 2005). AG dilaporkan sebagai penangkap radikal bebas dan inducer dari diferensiasi dan apoptosis pada sel *line* leukemia, kanker paru-paru, adenokarsinoma kolon, prostat, dan serviks serta pada sel limfosit normal (Inoue *et al*, 1994; Locatelli *et al*, 2008; Kawada *et al*, 2001; Salucci *et al*, 2002; Lo *et al*, 2010; You *et al*, 2010; Sohi *et al*, 2003). Asam galat

berperan penting dalam mencegah perkembangan dan transformasi keganasan kanker (Taraphdar *et al*, 2001).

Berbagai penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa asam galat mempunyai kemampuan untuk menghambat proliferasi sel kanker kolon hingga menyebabkan apoptosis. Kasimsetty *et al*, (2010) dan Mejia *et al*, (2009) melaporkan bahwa asam galat memiliki aktivitas antiproliferasi terhadap sel *line* kanker kolon HT-29. Sedangkan Salluci *et al*, (2009) juga melaporkan bahwa asam galat berperan penting dalam pencegahan kanker kolon melalui penghambatan siklus sel epitelial dan memiliki fungsi antiproliferatif. Selanjutnya Hwang *et al*, (2007) mengemukakan bahwa AG mampu menghambat dan menurunkan ekspresi COX-2 pada sel HT-29 melalui modulasi AMPK (*AMP-activated protein kinase*). Penurunan ekspresi COX-2 akibat dari terhentinya sekresi PGE2 dengan inhibisi AMPK. Aktivasi AMPK juga menyebabkan penurunan VEGF (*vascular endothelial growth factor*) and *glucose transporter, Glut-1* pada perlakuan tersebut.

Aktivitas spesifik derivat asam galat yaitu metil galat sebagai antikanker kolon dilaporkan oleh Forester *et al*, (2010) dan Forester *et al*, (2014) yaitu menghambat proliferasi dan menginduksi apoptosis sel *line* Caco-2 kanker kolon melalui aktivasi caspase 3. Senyawa derivat 4,4-di-O-metil asam elagat menunjukkan aktivitas inhibisi terhadap proliferasi sel kanker kolon (Molina *et al*, 2015). Jara *et al*, (2014) juga melaporkan bahwa derivat asam galat berupa senyawa trifenilfosfonium (ion) kation secara signifikan menghambat pertumbuhan kanker pada tikus. Selanjutnya Locateli *et al*, (2009) melaporkan bahwa senyawa derivat asam galat yaitu oktil, desil, dodesil dan tetradesil galat memberikan efek kematian sel melalui apoptosis pada sel melanoma B16F10.

Studi hubungan aktivitas struktur molekul derivat asam galat dilaporkan oleh Fiuza *et al*, (2004) bahwa aktivitas sitotoksik derivat asam galat bergantung pada kecepatannya masuk ke dalam sel dan secara langsung berkaitan dengan lipofilisitas. Sifat keduanya dipengaruhi oleh substituen gugus hidroksil pada cincin benzena dan panjang rantai gugus alkil ester. Selain itu, hidrofobisitas rantai alkil dari derivat asam galat berperan penting untuk aktivitas inhibitor

proliferasi (Dodo *et al*, 2008) dan kemungkinan juga berkontribusi dalam meningkatkan afinitas untuk permeabilitas sel dan atau memberikan interaksi dengan molekul target (Saeki *et al*, 2000). Asam galat merupakan senyawa alkil ester yang memiliki lipofilisitas rendah sehingga berakibat pada absorpsi dan bioavailabilitas yang rendah dalam tubuh. Senyawa ester mudah terhidrolisis dan memberikan efek sangat kecil atau bahkan tidak berefek. Selain itu, penelitian sebelumnya aktivitas derivat asam galat berupa isobutil dan isoamil galat memberikan aktivitas penghambatan terhadap sel kanker kolon HCT-116 dengan IC_{50} sebesar $>51,2 \mu\text{g/mL}$ (Panjaitan, 2015).

Hasil kajian beberapa studi pustaka terkait modifikasi struktur dan mekanisme aksi *lead compound* asam galat, mendorong penulis untuk mendesain dan memodifikasi struktur kimia asam galat dengan menambahkan gugus alkil berupa benzil, penambahan gugus hidroksi dan substitusi gugus OH menjadi OCH_3 . Penelitian Ritchie & Macdonald, (2009) melaporkan bahwa jumlah cincin aromatis dalam senyawa mempengaruhi faktor kelarutan, lipofilisitas dan inhibisi. Semakin banyak jumlah cincin aromatis maka kelarutan senyawa makin kecil dan lipofilisitas makin besar. Selain itu, gugus hidroksi juga memiliki kemampuan meningkatkan aktivitas penghambatan terhadap sel kanker (Hanafi & Thelma, 1998). Sehingga diharapkan dapat meningkatkan lipofilisitas dan aktivitas penghambatannya terhadap sel kanker.

Penelitian ini dibagi menjadi empat tahapan yaitu desain dan modifikasi struktur kimia asam galat dengan menambahkan gugus benzil, hidroksi dan substitusi OH menjadi OCH_3 . Selanjutnya melakukan simulasi docking dengan target makromolekul BRAF. Tahap berikutnya mensintesis senyawa derivat asam galat berdasarkan nilai *binding energy* terkecil hasil simulasi docking. Kemudian tahap terakhir melakukan uji sitotoksik terhadap sel kanker kolon HCT-116 untuk melihat seberapa besar aktivitas penghambatan senyawa hasil sintesis.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang, rumusan masalah penelitian ini adalah :
“Apakah senyawa derivat asam galat hasil simulasi *docking* dengan *binding energy* terkecil dapat disintesis dan memberikan aktivitas sitotoksik yang lebih

baik terhadap sel *line* kanker kolon HCT-116 dibandingkan dengan *lead compound*'

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum :

Tujuan umum penelitian adalah untuk mensintesis senyawa derivat asam galat serta menguji aktivitas sitotoksitasnya terhadap sel *line* kanker kolon HCT-116.

1.3.2 Tujuan khusus :

1. Mendesain dan memodifikasi struktur *lead compound* asam galat menjadi senyawa derivat asam galat
2. Melakukan simulasi *docking* untuk mengetahui nilai *binding energy* terkecil yang menunjukkan ikatan antara senyawa derivat asam galat (sebagai ligan) dengan BRAF (sebagai target molekul *docking*)
3. Mensintesis senyawa derivat asam galat dengan nilai *binding energy* terkecil berdasarkan hasil simulasi *docking*
4. Melakukan uji aktivitas terhadap sel *line* kanker kolon HCT-116

1.4. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat untuk :

1. Peneliti : menambah pengetahuan dan wawasan dalam bidang penelitian diantaranya tentang simulasi *docking*, sintesis senyawa derivat asam galat, serta uji aktivitas terhadap penghambatan sel *line* kanker kolon HCT-116.
2. Masyarakat : memberikan informasi bahwa senyawa derivat asam galat mempunyai aktivitas antikanker kolon.
3. Perusahaan : dapat menjadi dasar pertimbangan dalam pengembangan obat antikanker kolon dari senyawa derivat asam galat
4. Pemerintah : membantu program pemerintah dalam mengembangkan senyawa-senyawa antikanker khususnya senyawa derivat asam galat sebagai antikanker kolon.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

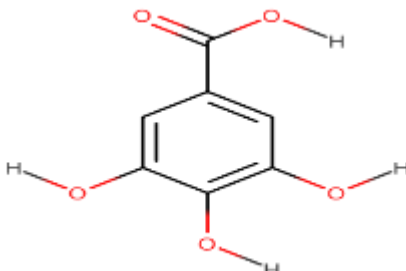
2.1. Asam Galat

Asam galat (*3,4,5-trihidroksi benzoic acid*) merupakan senyawa polihidroksifenolik dengan unit dasar asam tanat yang secara luas terdapat dalam tanaman alami (Ng *et al*, 2004) seperti anggur, teh hijau, buah delima (Veluri *et al*, 2006; Zuo *et al*, 2002; Kam *et al*, 2013), stroberi, dan pisang (Sun *et al*, 2002). Dalam skala industri, bahan kimia ini penting digunakan untuk industri farmasi, makanan, dan zat warna (Lee, 2001).

2.1.1. Nama, Struktur, dan Sifat Fisikokimia Asam Galat

Berikut adalah keterangan nama, struktur dan sifat fisiko kimia asam galat (tabel 2.1).

Tabel 2.1 Nama, Struktur, dan Sifat Fisiko Kimia Asam Galat (NCBI)

Nama IUPAC	: 3,4,5-trihydroxybenzoic acid
Nama Kimia	: Asam Galat
Struktur	: 
Rumus Kimia	: C ₇ H ₆ O ₅
Bobot Molekul	: 170,11954 g/mol
Log P	: 0,7
Konstanta Disosiasi (pKa)	: 4,4
Jumlah Ikatan Hidrogen Donor	: 4
Jumlah Ikatan Hidrogen Akseptor	: 5
Warna dan Bentuk	: Kristal tidak berwarna atau sedikit kekuningan berbentuk jarum

Titik lebur	: Menyublim pada 210 °C
Kelarutan	: 1 g larut dalam 87 mL air, 3 mL air mendidih, 6 mL alkohol, 100 mL eter, 10 mL gliserol, 5 mL aseton, praktis tidak larut dalam benzena, kloroform, dan petroleum eter

2.1.2. Farmakologi Asam Galat

2.1.2.1. Absorpsi, Distribusi, dan Ekskresi

Mekanisme absorpsi asam galat setelah pemberian tablet secara oral berlangsung cepat pada manusia. Waktu yang dibutuhkan untuk mencapai t_{\max} adalah $1,27 \pm 0,20$ jam (Koyama & Bitsch, 2001). Metabolit asam galat yang teridentifikasi melalui urine adalah 4-o-asam metil galat sebagai metabolit utama, 3-o-asam metil galat, dan 3,4-o-asam dimetil galat (Hodgson *et al*, 2000). Sedangkan bentuk terglukoronidasi hanya ditemukan dalam jumlah yang kecil. Jumlah total asam galat yang dikeluarkan melalui urin sebagai bentuk yang tidak berubah dan metabolit utamanya 4-0-methyl galat adalah 36,4+4,5 % (Koyama & Bitsch, 2001).

2.1.2.2. Efek Farmakologi

Asam galat adalah senyawa polifenol yang mempunyai peran penting dalam berbagai aktivitas selektif terhadap banyak sel *line*. Asam galat secara luas ditemukan pada berbagai tanaman, buah-buahan, dan makanan, baik dalam bentuk bebas ataupun terikat dengan bahan lain (Niemetz & Gross, 2005). Beberapa penelitian melaporkan aktivitas farmakologi asam galat yaitu diantaranya sebagai antibakteri (Kang *et al*, 2008), antiviral (Kratz *et al*, 2008), anti-inflamatori (Kim *et al*, 2006), dan antikanker seperti leukemia (Inoue *et al*, 2000), kanker prostat (Agarwal *et al*, 2006; Kaur *et al*, 2009; Veluri *et al*, 2006), kanker paru-paru (Kawada *et al*, 2001), kanker lambung, kolon, payudara, servik, dan esopagel (Faried *et al*, 2007; You *et al*, 2010).

2.1.2.3. Beberapa Target Molekuler Asam Galat Sebagai Antikanker

Target molekuler asam galat sebagai senyawa antikanker yang telah ditelaah oleh Verma, Singh, dan Mishra (2013) dari berbagai jurnal yaitu sebagai berikut :

a. Aktivasi ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) kinase

Asam galat menunjukkan efek yang kuat dalam proses aktivasi ATM. Aktivasi ATM menyebabkan aktivasi Chk2. Aktivasi protein Chk2 mengakibatkan inaktivasi protein cdc25. Kondisi ini mengakibatkan siklus sel dari fase G2 ke M menjadi terhenti sehingga sel berada dalam kondisi istirahat dan tidak terjadi proliferasi sel.

b. Penghambatan Enzim *Ribonucleotide reductase* (RR)

Ribonucleotide reductase (RR) merupakan enzim yang berperan penting dalam menentukan kecepatan sintesis de novo DNA dan aktivitasnya rendah untuk sel normal. Ekspresi enzim ini secara signifikan meningkat pada sel tumor ganas. Enzim RR berperan dalam proses perubahan NTP menjadi dNTP dalam sintesis DNA. Asam galat diketahui menghambat enzim ini dan menyebabkan penurunan konsentrasi dNTP khususnya dATP dan dGTP intraseluler. Perubahan dalam keseimbangan konsentrasi dNTP ini menyebabkan penghambatan sintesis DNA pada sel tumor yang proliferasinya cepat.

c. Penghambatan enzim *Cyclooxygenase-2*

Efek antikanker obat non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) diketahui berhubungan dengan inhibisi aktivitas COX-2 yang menyebabkan penurunan produksi prostaglandin. Reddy et al (2012) melaporkan bahwa asam galat menghambat enzim COX-2 pada sel sumsum tulang belakang K562 dan juga IR-K562.24.

d. Penurunan konsentrasi *gluthation* (GSH)

GSH (*Gluthation*) merupakan zat yang berperan sangat penting dalam proliferasi sel, siklus sel dan apoptosis. Penelitian menunjukkan efek apoptosis obat anti kanker yaitu dengan menurunkan konsentrasi GSH. Kematian sel akibat asam galat mungkin berkaitan dengan stres oksidatif yang disebabkan kenaikan tingkat ROS dan disfungsi mitokondria. Asam galat meningkatkan jumlah sel

yang mengalami penurunan jumlah GSH pada sel-sel kanker paru-paru.

e. Penghambatan *UDP-glucose dehydrogenase*

UDP-glucose dehydrogenase (UGDH) mengkatalisis konversi UDP-glukosa menjadi UDP-glukoronat dengan dua tahap oksidasi NAD^+ . UDP-glukoronat merupakan prekursor glikosaminoglikan seperti hyaluronan (HA), memiliki efek yang signifikan dalam proses perkembangan sel. Peningkatan konsentrasi UDP-asam glukoronat dapat menyebabkan peningkatan proteoglikan yang berperan dalam perkembangan kanker epitel. UGDH pada sel kanker payudara merupakan gen yang produksinya mengalami peningkatan secara dramatis sebagai respon terhadap peningkatan androgen. Dengan demikian, menurunkan konsentrasi UDP-asam glukoronat pada sel-sel tumor dengan menghambat aktivitas UGDH dapat menjadi strategi terapi kanker yang baru.

f. Induksi apoptosis

Asam galat menginduksi terjadinya apoptosis pada sel preadiposit 3T3-L1 dan beberapa sel *line* termasuk sel HeLa. Terdapat dua jalur bagaimana apoptosis terjadi yaitu jalur yang tergantung mitokondria (intrinsik) dan melalui jalur reseptor di membran sel (ekstrinsik). Asam galat secara signifikan mengaktifkan protein Fas, FasL dan P53. Kedua jalur apoptosis tersebut diatur oleh protein famili Bcl-2. Protein famili Bcl-2 terdiri dari golongan pro apoptotis yaitu Bax, Bak, Bad dan Bcl-XS dan golongan protein antiapoptosis yaitu Bcl-2, Bcl-XL dan Mcl-1. Rasio ekspresi Bax/Bcl-2 merupakan faktor yang menentukan proses apoptosis. Asam galat meningkatkan jumlah protein Bax dan menurunkan protein Bcl-2 pada sel pre adiposit 3T3-L1 dan sel HeLa. Hal ini menyebabkan induksi proses apoptosis pada sel tumor.

g. Efek antiangiogenesis

Proliferasi sel-sel endotel merupakan tahapan penting dalam angiogenesis. Asam galat secara efektif menghambat proliferasi sel endotel EA.hy926 dan *Human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC) yang kemungkinan disebabkan oleh inhibisi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). *Cyclin* menunjukkan peranan yang penting dalam mengatur aktivitas *Cyclin dependent kinase* (CDK). *Cyclin* D1 dan E menyebabkan percepatan perubahan fase G1 ke fase S. Asam

galat menurunkan ekspresi *cyclin* D1, *cyclin* E dan CDK4 dan memblokir fosforilasi *Retinoblastoma* (Rb). Hal ini yang mungkin berperan dalam penghambatan proliferasi EA.hy926. Angiogenesis juga ditandai dengan vasodilatasi yang disebabkan oleh *Nitric Oxide* (NO) dan peningkatan permeabilitas vaskular pada kapiler sebagai respon terhadap VEGF. VEGF adalah mediator yang penting dalam produksi *endothelial Nitric Oxide Synthase* (eNOS) yang dikatalisis NO melalui reseptor VEGF-2. Asam galat diketahui memiliki efek inhibisi aktivitas eNOS dan menyebabkan reduksi angiogenesis secara signifikan. Dengan demikian, asam galat mencegah proliferasi sel dan angiogenesis karena penghambatannya terhadap VEGF.

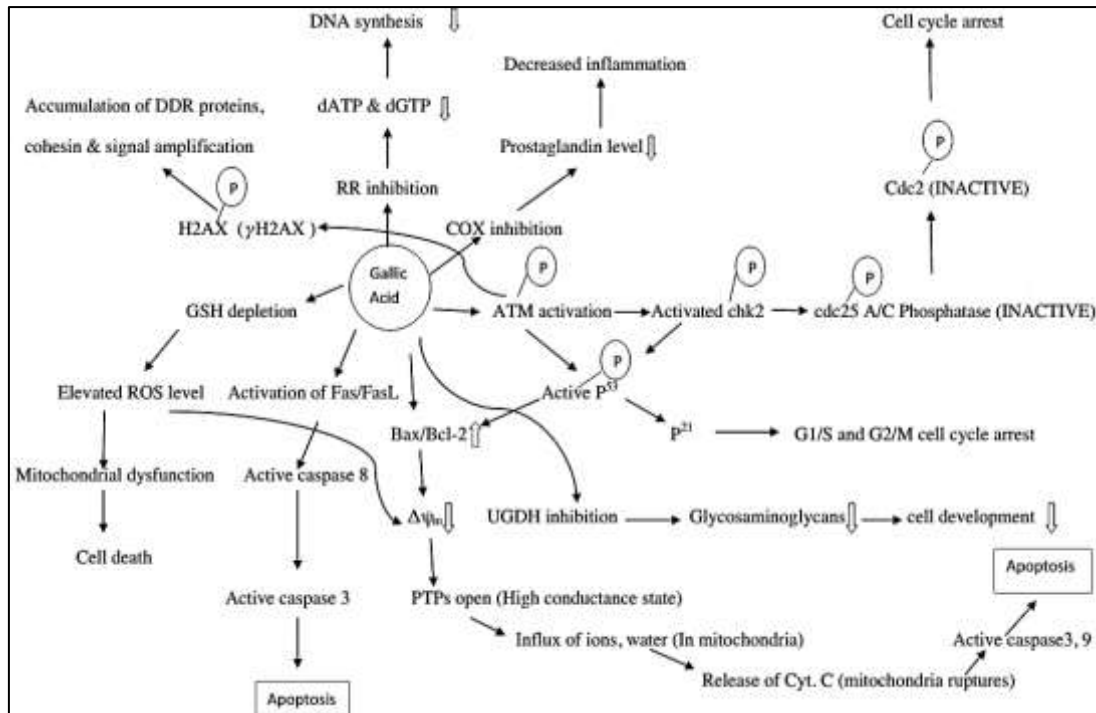
h. Penghambatan invasi sel kanker

Tingkat ekspresi ADAM17, p-Akt, dan p-Erk diturunkan dengan pemberian asam galat baik pada sel *line* U87 maupun U251n. Asam galat menghambat fosforilasi baik PI3K/Akt dan jalur transduksi sinyal Ras/MAPK yang menyebabkan hambatan dalam survival, invasi dan proliferasi sel. ADAM17 atau *tumor necrosis factor- α converting enzyme* (TACE) merupakan enzim yang bertanggungjawab dalam pelepasan TNF- α dari membran plasma. ADAM17 menyebabkan migrasi sel progenitor syaraf dan berkontribusi dalam perkembangan tumor otak dan proses invasinya. Asam galat diketahui memiliki efek penurunan ekspresi ADAM17 dan juga menghambat fosforilasi baik PI3K/Akt dan jalur transduksi sinyal Ras/MAPK yang menyebabkan hambatan dalam survival, invasi dan proliferasi sel.

i. Penghambatan NF- κ B

Penghambatan aktivitas NF- κ B oleh asam galat dapat memberikan efek sebagai kemopreventif dalam karsinogenesis.

Mekanisme asam galat secara ringkas dapat dilihat pada gambar 2.2.



Gambar 2.2 Mekanisme Aksi Asam Galat Sebagai Antikanker (Verma *et al*, 2013)

2.2. Kanker Kolon

2.2.1. Definisi Kanker Kolon

Kanker kolon merupakan kanker yang berkembang pada salah satu organ pencernaan, yaitu usus (Rominiyi *et al*, 2011). Kebanyakan kanker kolon berawal dari sel yang tidak ganas yang disebut adenoma yang dalam stadium awal membentuk polip (sel yang tumbuh sangat cepat). Pada stadium ini, polip dapat diangkat dengan mudah. Adenoma seringkali tidak menunjukkan gejala tertentu, sehingga tidak terdeteksi dalam waktu relatif lama. Pada kondisi tertentu, adenoma tersebut dapat berpotensi menjadi kanker yang dapat terjadi pada semua bagian kolon (Gryfe *et al*. 1997). Kanker kolon juga berperan dalam perkembangan kanker kolorektal, yaitu kanker yang menyerang kolon dan rektum (Nemoto *et al*. 2009).

2.2.2. Etiologi dan Epidemiologi

Sebagian besar kanker kolon berasal dari polif terutama adenoma, karena tidak semua polif kolon akan menjadi kanker (Simadibrata, 1990). Etiologi kanker

kolon secara khusus, untuk faktor penyebabnya belum diketahui dengan jelas (Tambunan, 1993). Hasil survei penelitian mengenai kasus kanker kolon menyimpulkan bahwa sekitar 5-10% kanker kolon dan rektum disebabkan oleh faktor genetik yang diwariskan. Selebihnya disebabkan oleh hal lain yang berkaitan dengan makanan, gizi dan aktifitas fisik (World Cancer Research Fund, 2011).

Kejadian rata-rata kanker kolon di seluruh dunia adalah 16,6/100.000 untuk pria dan 14,7/100.000. Di dunia insiden kanker kolon tertinggi adalah pria amerika keturunan jepang mencapai 37,15/100.000, untuk wanita tertinggi di Selandia Baru mencapai 30,46/100.000. Insiden kanker kolon terendah pria dan wanita adalah di Afrika dan India (Desen, 2008).

2.2.3. Patologi (Desen, 2008)

1. **Klasifikasi Makroskopik** : terbatas pada tunika mukosa dan submukosa disebut kanker usus besar stadium dini. Kanker usus besar dini umumnya tanpa sebaran ke kelenjar limfe, bila kanker sudah menginvasi lapisan submukosa, 5-10% kasus menunjukkan metastasis kelenjar limfe lokal. (a) Tipe menonjol : semua tumor yang massa utamanya menonjol ke dalam lumen usus termasuk tipe ini. Tumor tampak berbentuk nodular, polypoid. Massa tumor besar, permukaan mudah mengalami ulserasi berdarah, infeksi sekunder dan nekrosis. Umumnya terjadi di belahan kanan kolon; (b) Tipe ulseratif : pada massa terdapat tukak yang agak dalam, bentuk luar mirip kawah gunung berapi, tepinya kokoh keras menonjol, dasarnya tidak rata, nekrosis, derajat keganasan tinggi, metastasis limfogen lebih awal, dan sebagai adenokarsinoma; dan (c) Tipe infiltratif : paling sering ditemukan pada kolon sigmoid dan bagian atas rektum, derajat keganasan tinggi, dan sebagai adenokarsinoma berdiferensiasi.
2. **Klasifikasi Histologik** : frekuensi yang paling banyak untuk karsinoma usus besar adalah adenokarsinoma mencapai 90% dengan beberapa jalur penyebaran, yaitu penyebaran lokal, penyebaran limfogen, metastasis hematogen, dan metastasis implantasi.

2.2.4. Diagnosis dan Terapi

Diagnosis pada kanker kolon dapat dilakukan dengan cara :

1. Gejala Klinis Sebagai Dasar : Gejala klinis kanker usus besar stadium dini umumnya tidak menonjol, mudah terabaikan oleh pasien ataupun dokter. Gejala-gejala yang dapat menjadi indikasi kanker yaitu rasa tak enak perut kontinu, nyeri samar, kembung, perubahan pola defekasi, timbul obstipasi/diare, hematokezia, anemia/penurunan berat bada dengan sebab tidak jelas, dan lain-lain.
2. Pemeriksaan Fisik : Inpeksi dan palpasi bagian abdomen, periksa ada tidaknya massa. Kanker kolon belahan kanan 90% lebih teraba massa, dengan colok dubur (mudah dan sederhana). Harus diketahui lokasi massa, bentuk, ukuran, derajat mobilitas, dan lain-lain.
3. Endoskopi : Sekitar 70-75% kanker usus besar terletak di dalam jarak 25 cm dari tepi anus dengan sigmoidoskopi dapat dilihat lesi, kolon di atas 25 cm dapat dilihat dengan kolonoskopi fiberoptik. Pada waktu pemeriksaan dapat dilakukan pemotretan, biopsy dan penyikatan untuk sediaan apusan bagi pemeriksaan sitologi.
4. Pemeriksaan Sinar-X, Pencitraan USG dan CT, MRI, dan Kolonoskopi virtual CT
5. PET (Tomografi Emisi Positron), Zat Penanda Tumor, dan Tes Darah Samar Fesesa
6. Pemeriksaan Sitologi (Desen, 2008)

Metode terapi yang digunakan dalam perlakuan kanker kolon diantaranya yaitu operasi (terapi utama pada kanker kolon), kemoterapi, radioterapi, kombinasi terapi (termokemoterapi/termoradioterapi), terapi biologis, dan pengobatan tradisional china (Desen, 2008).

1. Pembedahan

Menurut sejarah pengobatan kanker, penyembuhan kanker yang pertama dicapai dengan pembedahan. Dan memang selama tumor masih bersifat lokal, terapi pilihan adalah bedah.

2. Radioterapi

Radioterapi pada waktu awalnya bertujuan untuk pengobatan *paliatif* saja. Dengan perkembangan metode radiasi yang lebih baik, ternyata radioterapi dapat menyembuhkan pula beberapa macam tumor. Prinsip cara ini adalah penghancuran sebanyak mungkin sel-sel kanker dan sedikit mungkin merusak jaringan yang sehat. Terapi ini dapat dilakukan terhadap *rekurensi* pasca operasi dan metastasis jauh (misalnya ke tulang, hati, paru-paru, otak), juga dapat

diberikan radioterapi secara selektif, untuk mengurangi gejala (misal nyeri, dll), dan memperpanjang usia (Desen, 2008).

3. Kemoterapi

Prinsip pengobatan kemoterapi pada kanker adalah mengeliminasi sel-sel kanker yang sedang dalam siklus pembelahan. Kebanyakan obat kemoterapi bekerja dengan jalan merusak *enzim* atau *substrat* yang dipengaruhi oleh sistem *enzim*. Sebagian besar efek pada *enzim* atau *substrat* berhubungan dengan *sintesa* DNA, dengan demikian obat sitostatika yang bersifat anti tumor menghambat sel yang sedang membentuk DNA (Desen, 2008).

4. Target Terapi

Target terapi merupakan terapi dengan suatu molekul obat spesifik dengan sasaran yang tepat dan tidak mempengaruhi sel normal. Prinsip dari target terapi adalah membunuh langsung sel tumor, induksi apoptosis, menghambat metastasis sel tumor, menghambat neoangiogenesis, dan menstimulus imunitas anti tumor. Pengobatan seperti ini tidak hanya mengurangi gejala suatu penyakit tetapi dapat menyembuhkan atau memperbaiki bagian yang sakit. Hanya saja perlu dilakukan diagnosis dini untuk menentukan langkah-langkah pengobatan (Radji, 2014).

2.3. Karsinogenesis Kanker Kolon

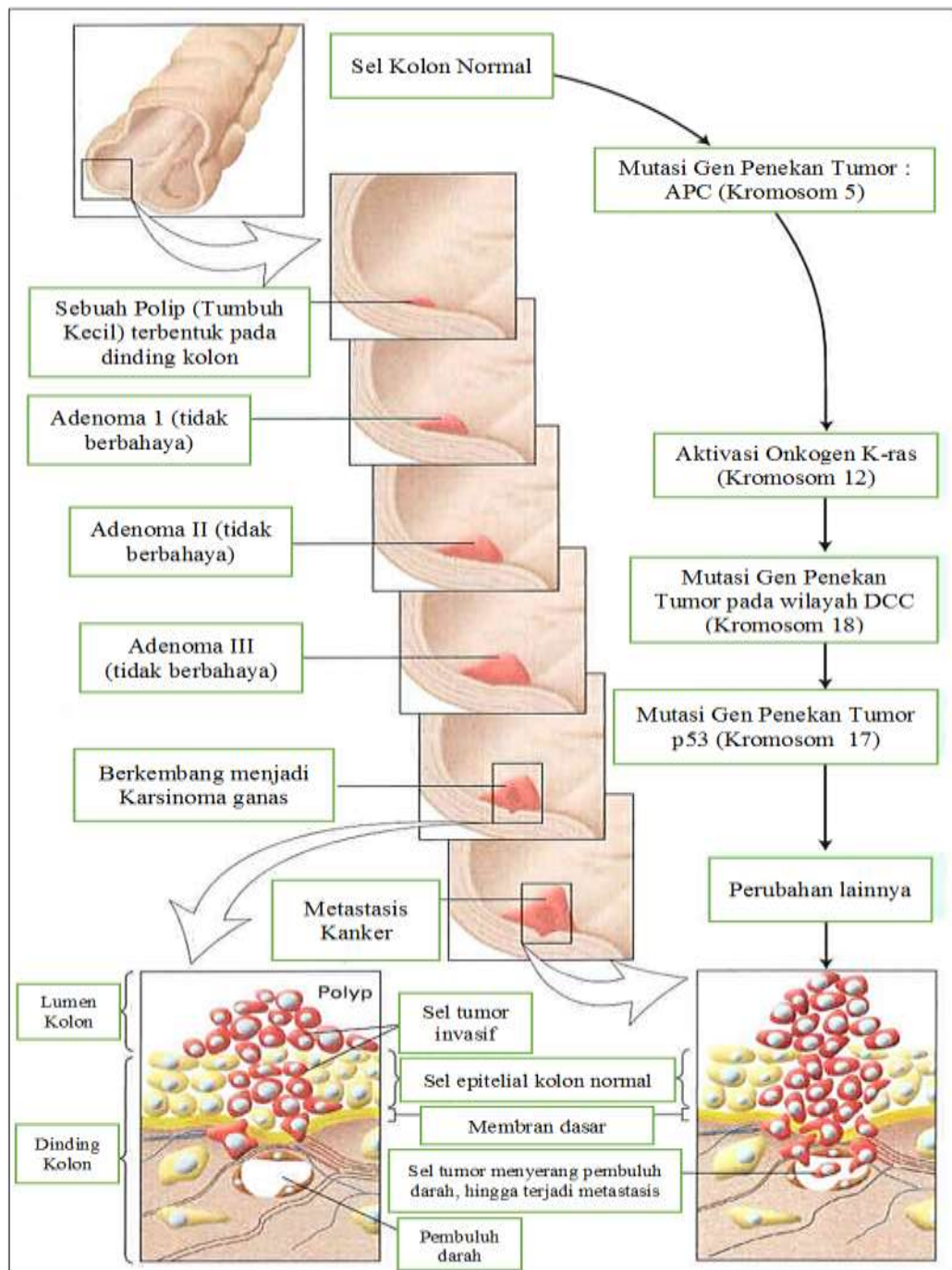
Pada kanker kolon mutasi terjadi pada gen penekan tumor (*tumor supresor gene* : TSG) seperti gen APC (*Adenomatous Polypopsi Coli*), p53 dan lainnya maupun pada oncogen seperti K-ras. Mutasi gen APC bersifat heriditer

(diwariskan) sehingga individu yang membawa gen APC termutasi tersebut beresiko lebih besar untuk terkena kanker usus dibanding individu yang tidak membawanya (Lodish *et al*, 2003). Gen APC menyandikan suatu protein yang berfungsi sebagai penekan tumor untuk mengatur pembelahan sel-sel epitel usus. Mutasi pada gen APC menyebabkan kerusakan genetik yang menyebabkan aktivasi onkogen K-ras dan hilangnya gen penekan tumor DCC dan p53, yang mengakibatkan pembelahan sel yang tidak terkontrol (Powell *et al*. 1993). Namun demikian, kesalahan genetika yang terkait dengan faktor keturunan tidak secara otomatis berubah menjadi sel kanker. Ada faktor eksternal lainnya yang diperlukan untuk mengubahnya menjadi sel kanker.

Faktor luar (eksternal) diantaranya virus, infeksi berkelanjutan, radiasi, polusi udara dan bahan-bahan kimia yang tidak diperlukan oleh tubuh (xenobiotik) juga dapat menyebabkan mutasi. Mutasi gen karena faktor eksternal terjadi pada sel somatik, khususnya pada organ yang sering mengalami pergantian sel atau melakukan fungsi sekresi, seperti payudara dan rahim (Zakaria, 2001).

Perubahan dari sel normal menjadi sel kanker berlangsung secara bertahap, meliputi tahap inisiasi, promosi dan progresi (Barret, 1993). Inisiasi merupakan tahap terjadinya perubahan DNA/mutasi gen yang disebabkan oleh beberapa faktor internal maupun eksternal. Mutasi ini terjadi pada kelompok protoonkogen dan TSG. Protoonkogen menyandi *growth factor*, *growth factor receptor*, enzim maupun faktor transkripsi yang mempromosi pertumbuhan dan atau pembelahan sel. Protoonkogen yang termutasi dinamakan onkogen. Pada tahap inisiasi, onkogen teraktivasi sedangkan TSG mengalami inaktivasi. Tahap selanjutnya adalah promosi yakni perkembangan klon sel menjadi sel tumor/premalignant. Sel kemudian memasuki tahap progresi yakni sel kanker berkembang tanpa kendali. Sel kanker memiliki ciri yang berbeda dengan sel normal. Mutasi di beberapa gen ditemukan pada kanker kolon (Gambar 2.3). Mutasi pada gen penekan tumor APC mengakibatkan sel tumbuh membentuk polip. Mutasi selanjutnya terjadi pada onkogen ras dan TSG DCC (*deleted colorectal cancer*) serta p53. Kondisi tersebut mengakibatkan pembelahan sel

tidak terkendali. Meskipun demikian, tidak semua mutasi diperlukan agar sel normal berubah menjadi sel kanker (Lodish *et al*, 2003).



Gambar 2.3 Karsinogenesis Pada Kanker Kolon [telah diolah kembali] (Lodish *et al*, 2003)

2.4. Protein BRAF

2.4.1. Protein BRAF

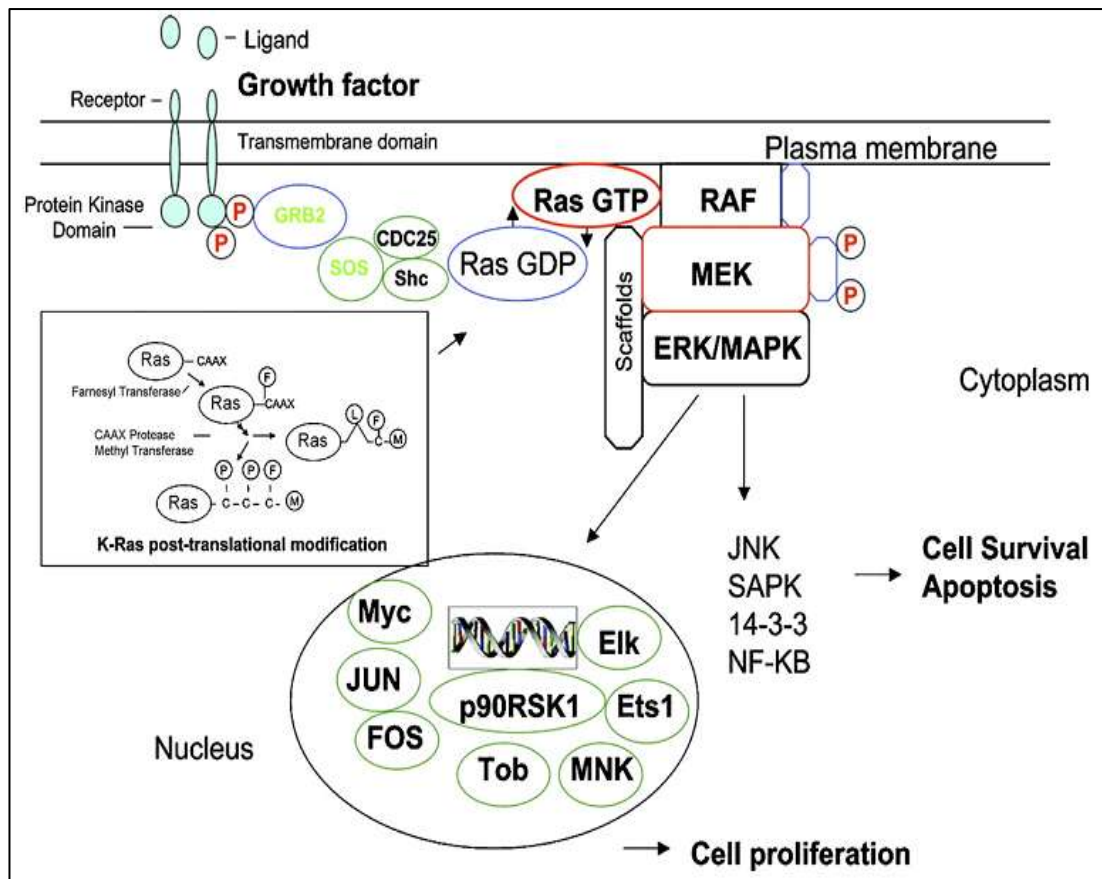
Raf (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*) merupakan reseptor tirosin kinase yang memiliki aktivitas kinase serin / treonin. Kinase ini berfungsi dan berhubungan dengan jalur Ras-Raf-MEK-ERK *mitogen activated protein kinase* (MAPK) (McCurbery et al, 2007). RAF protein kinase berperan sentral dalam jalur transduksi sinyal MAPK dan memiliki peranan penting untuk memediasi proliferasi sel, kelangsungan hidup, dan angiogenesis dalam berbagai model kanker (Luo, Xie, & Marmorstein, 2008). Diketahui ada tiga isoform Raf pada mamalia yaitu A-Raf, B-Raf, dan C-Raf (Leitch et al, 2007). Isoform B-Raf adalah yang terbesar, terdiri atas 766 residu dengan berat molekul 84,4 KDa yang terbagi atas tiga daerah yaitu CR1, CR 2, dan CR 3 (Harris, 2014). CR 1 mengandung ikatan Ras, CR 2 mengandung domain regulatori, dan CR 3 mengandung domain kinase (McCurbery et al, 2007).

2.4.2. Regulasi BRAF Kinase

Mitogen activated protein kinase (MAPK) yang meliputi kinase Ras-Raf-MAPK-MEK-ERK adalah jalur sinyal intraselular yang mentransmisikan rangsangan mitogenik ke nukleus melalui serangkaian peristiwa fosforilasi (Ramnath & Adjei, 2007). Jalur MAPK telah dilaporkan berperan penting pada perkembangan tumor untuk berbagai jenis kanker dengan deregulasi *signaling cascade* Ras-Raf-MEK-ERK (Johansson & Brage, 2014). Selain berperan dalam tumorigenesis, protein Raf dan jalur MAPK telah menunjukkan peran pentingnya dalam berbagai proses fisiologis normal seperti metabolisme seluler, progresi siklus sel, kematian sel dan fungsi neurologic (Leitch et al, 2007).

Jalur MAPK terkait dengan pertumbuhan sel normal dan tidak terkontrol untuk jalur Ras-Raf-MEK-ERK (Harris, 2014). Aktivasi faktor-faktor pertumbuhan mitogenik menginduksi dimerisasi dan aktivasi *receptor tyrosine kinase* (RTK) meliputi perekrutan Grb2 dan SOS1/SOS2 ke membran plasma. Selanjutnya SOS1/SOS2 mengaktifasi protein Ras dengan mengkatalisis pertukaran *guanine triphosphate* (GTP) dari *guanine diphosphate* (GDP). Ras-

GTP merekrut Raf homodimer inaktif dari sitosol menuju membrane plasma, selanjutnya teraktivasi dan terjadi fosforilasi. MAPK seperti Raf aktif, terfosforilasi dan mengaktivasi MEK (Tuveson et al, 2003). Selanjutnya MEK mengaktivasi ERK dan tertranslokasi menuju nucleus serta terfosforilasi dan teraktivasi oleh berbagai factor transkripsi (gambar 2.4) (Ramnath & Adjei, 2007).



Gambar 2.4 Jalur Ras/Raf/MEK/ERK (Ramnath & Adjei, 2007)

2.4.3. Ekspresi Protein BRAF

Aktivitas mutasi Braf telah ditemukan dalam jenis keganasan kanker diantaranya melanoma, kanker thyroid papiler, kanker kolorektal, tumor otak, kanker ovarium, kanker paru-paru, dan leukemia sel (Johansson & Brage, 2014). Sampai sekarang, mutasi B-Raf telah terdeteksi di 70% dari melanoma, 30% dari kanker tiroid, 15% dari kanker usus besar dan pada frekuensi yang lebih rendah di beberapa jenis kanker lainnya (Leitch et al, 2007). Sedangkan menurut Chan et al

(2003) pada kanker kolorektal ditemukan 36% mutasi B-Raf dan 18% mutasi Ras. Sebagian besar mutasi diidentifikasi dalam domain kinase, dengan substitusi asam amino tunggal (valin tunggal ke glutamate) pada residu 600 (Braf^{V600E}), terhitung hingga 90% mutasi (Qin et al, 2012).

2.5. Rancangan Obat Berbantu Komputer

Rancangan obat berbantu komputer (ROBK) merupakan alat yang sangat berguna dalam desain obat rasional untuk meminimalkan waktu pada tahap identifikasi, karakterisasi, dan optimasi struktur sebagai kandidat obat baru (Cheng *et al*, 2006) serta menjadi *tools* yang sangat penting bagi akademisi dan industri farmasi selama satu dekade terakhir (Lill *et al*, 2011). ROBK juga dapat berguna untuk desain rasional prodrug. Prodrug secara khas didesain untuk meningkatkan spesifisitas dan bioavailabilitas molekul obat asli (Balakrishnan, 2006). Metodologi yang umum digunakan dalam ROBK berbasis struktur adalah teknik docking dan mekanika molekular. Sebagian besar problem docking menggunakan identifikasi senyawa penuntun dan memprediksi cara mengikat selama proses penambatan senyawa obat (Lill *et al*, 2011).

Teknik simulasi docking memegang peranan penting dalam perancangan obat dan memahami mekanisme bagaimana masuknya suatu molekul ke dalam situs pengikatan (*binding site*) pada makromolekul target membentuk ikatan nonkovalen (Perven *et al*, 2011). Simulasi docking memprediksi konformasi kompleks ligan-protein dan mengkalkulasi afinitas pengikatannya. Secara umum, interaksi ligan-protein adalah interaksi non kovalen yang mencakup ikatan hidrogen, interaksi ionik, interaksi hidrofobik, interaksi π - π dan interaksi kation- π (Fong *et al*, 2010). Interaksi ligan-protein diprediksi dengan dua fungsi utama yakni “penambatan/docking” dan “penilaian/scoring”. Fungsi pertama mencakup pembuatan konformasi-konformasi ligan-protein yang disebut “posisi/pose” ataupun penyampelan konformasi yang mungkin pada kantung ikatan protein. Umumnya, program penambatan melakukan proses pencarian posisi dengan pola ligan yang fleksibel dan protein yang kaku. Setiap posisi dievaluasi (dinilai) berdasarkan bentuk dan karakteristik seperti elektrostatik untuk menemukan

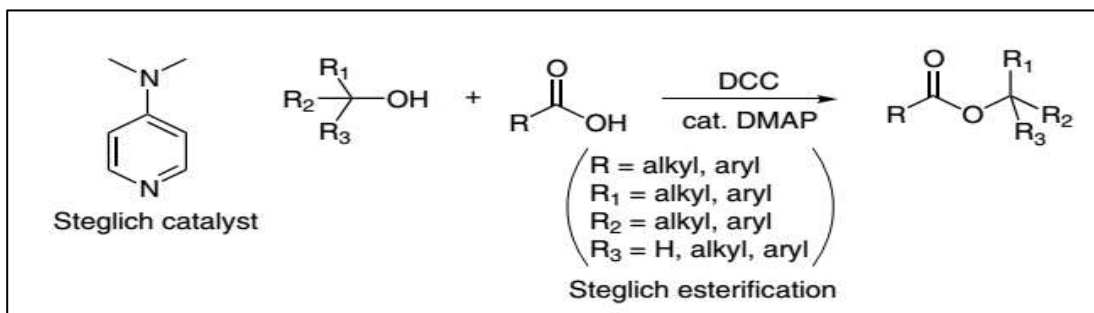
posisi yang paling disukai (Okinomoto *et al.*, 2009).

Pemilihan ligan yang digunakan dalam simulasi docking terhadap protein target dilakukan dengan skrining awal berdasarkan kriteria dari aturan Lipinski. Ligan dianggap memiliki potensi dapat masuk ke dalam membran sel dan diserap oleh tubuh jika memenuhi aturan Lipinski dengan kriteria: (1) berat molekul <500 gram/mol, (2) jumlah grup donor proton ikatan hidrogen <5, (3) jumlah grup akseptor proton ikatan hidrogen <10, (4) nilai logaritma koefisien partisi dalam air dan 1-oktanol <5 (Lipinski *et al.* 2001).

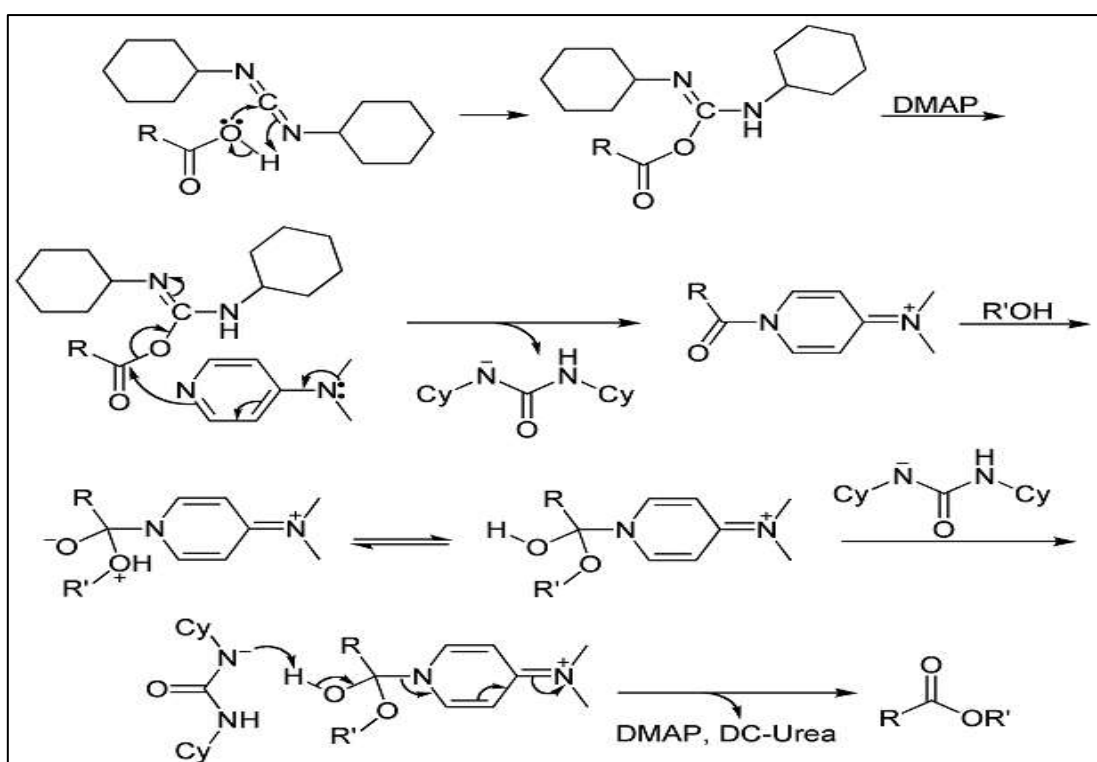
2.6. Reaksi Esterifikasi, Metilasi, dan Hidrolisis

2.6.1. Reaksi Esterifikasi

Esterifikasi merupakan reaksi pembuatan ester. Suatu ester dapat dibentuk dengan reaksi langsung antara suatu alkohol dan asam karboksilat. Ada beberapa cara dalam pembuatan ester, salah satunya adalah esterifikasi Steglich (Gambar 2.4). Esterifikasi steglich merupakan suatu esterifikasi yang menggunakan senyawa DCC (Diciclohexana carbodiimida) sebagai aktivator dan DMAP (Dimetil Amino Piridin) sebagai katalis. Dengan metode esterifikasi Steglich, substrat asam karboksilat yang sterik tetap dapat dibuat menjadi ester. Mekanisme ini dimulai ketika suatu asam karboksilat bereaksi dengan DCC membentuk senyawa intermediet O-asilisourea, yang kereaktifannya serupa dengan kereaktifan senyawa anhidrida karboksilat. Selanjutnya DMAP sebagai nukleofil yang lebih kuat dari alkohol bereaksi dengan O-asilisourea membentuk senyawa intermediet yang reaktif untuk direaksikan dengan alkohol membentuk ester (Gambar 2.5). Pada penelitian ini digunakan DIC (Di Isopropil Carbodiimide) untuk menggantikan DCC. Gugus yang penting untuk reaksi masih sama yang berbeda adalah rantai samping sikloheksil diganti dengan isopropil. Penggantian ini dilakukan dengan pertimbangan toksisitas reagen yang lebih rendah.

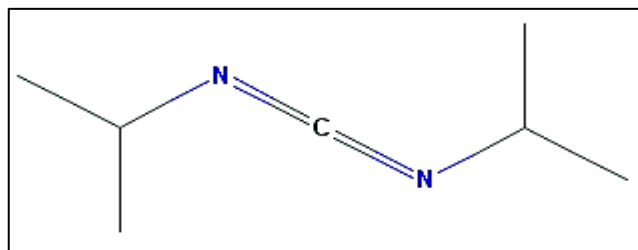


Gambar 2.5 Skema Umum Esterifikasi Steglich (Wang, 2010)



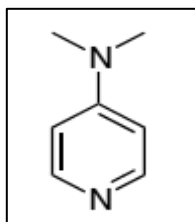
Gambar 2.6 Mekanisme reaksi esterifikasi Steglich (Wang, 2010)

DIC merupakan pereaksi organik yang digunakan sebagai aktivator dalam beberapa reaksi organik. Nama IUPAC dari DIC adalah N,N'-disopropilkarbodiimida dengan rumus molekul $C_7H_{14}N_2$. DIC memiliki massa molekul relatif 126.19946 g/mol.



Gambar 2.7 Struktur Kimia DIC (NCBI)

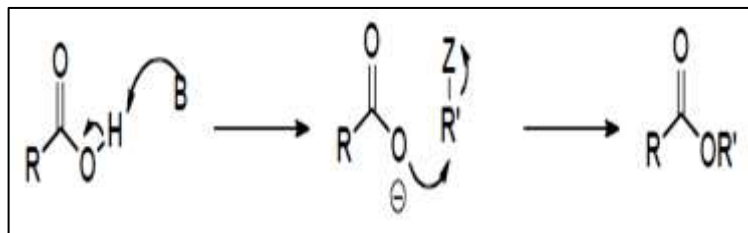
DMAP merupakan katalis nukleofilik yang dapat mengkatalisis beberapa reaksi salah satunya adalah esterifikasi. Nama IUPAC dari DMAP adalah 4-N,N'-dimetilaminopiridin dengan rumus molekul $C_7H_{10}N_2$. DMAP memiliki massa molekul relatif 122,17 g/mol dengan titik leleh $110-113^{\circ}C$ dan titik didih $162^{\circ}C$ pada tekanan 50 mmHg.



Gambar 2.8 Struktur Kimia DMAP (Wang, 2010)

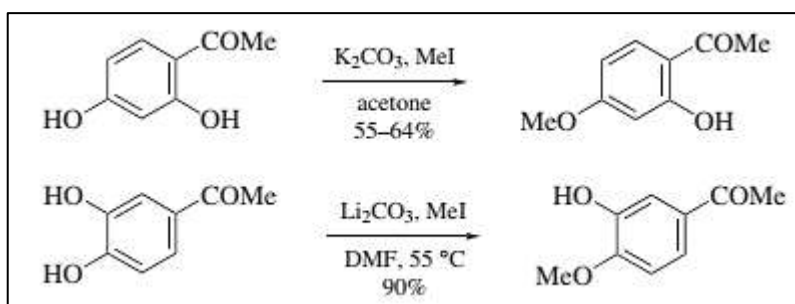
2.6.2. Reaksi Metilasi

Reaksi metilasi merupakan reaksi penggantian suatu atom atau molekul dengan gugus metil. Sumber elektrofil metil yang umum digunakan berasal dari reagen dimetil sulfat (DMS) atau metil halida (CH_3-X). Kajian tentang derivatisasi asam galat telah banyak dilakukan yaitu dengan melakukan metilasi terhadap gugus hidroksi pada asam galat (Chavez *et al*, 2006) yang disebut dengan reaksi O-metilasi. Salah satu cara reaksi metilasi adalah dengan menggunakan metil iodida dalam suasana basa yang kuat. Asam karboksilat dapat dirubah menjadi metil ester dengan mengaduk campuran asam karboksilat dalam metanol dengan metil iodida dalam jumlah yang berlebih dan potasium karbonat (gambar 2.8). Metil iodida berfungsi sebagai agen pengalkilasi. Potasium karbonat berfungsi untuk memberi suasana basa yang kuat.



Gambar 2.9 Reaksi O-metilasi Pada Asam Karboksilat

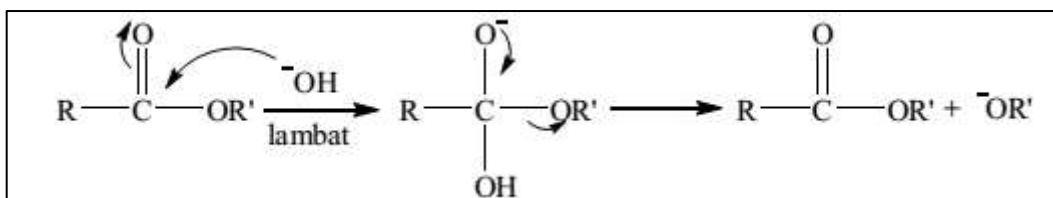
Hidroksil fenolik dapat dimetilasi dengan metil iodida dibawah kondisi basa. Misalnya, kondisi yang umum terjadi adalah metil iodida dengan kalium karbonat dalam aseton dan metil iodida dengan litium karbonat dalam DMF (Gambar 2.9) (Sulikowski, A. G & Sulikowski, M. M, 2005).



Gambar 2.10 Reaksi O-metilasi Fenol (Sulikowski, A.G & Sulikowski, M. M, 2005)

2.6.3. Reaksi Hidrolisis

Reaksi hidrolisis biasanya lebih disukai menggunakan katalis basa, karena asam yang terbentuk akan dihapus sebagai garam, sehingga mendorong reaksi ke depan sampai selesai. Mekanisme hidrolisis dengan basa diawali dengan pembentukan intermediet tetrahedral. Tahap berikutnya adalah terjadi pemutusan gugus asil (March, 1977).



Gambar 2.11 Mekanisme Reaksi Hidrolisis dengan Katalis Basa

2.7. Elusidasi dan Karakterisasi Senyawa Hasil Sintesis

2.7.1. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan metode pemisahan fisikokimia yang didasarkan atas penyerapan, partisi (pembagian) atau gabungannya. Kromatografi lapis tipis biasanya digunakan untuk pengecekan yang cepat terhadap komposisi campuran, menentukan kondisi percobaan dari kromatografi kolom, mengetahui kesempurnaan suatu reaksi, dan untuk identifikasi obat, ekstrak tanaman, preparat biokimia, serta mendeteksi kontaminan dan pemalsuan (Harmita, 2006).

Kelebihan kromatografi lapis tipis (KLT) diantaranya keserbagunaan, kecepatan dan kepekaan. Keserbagunaan KLT karena dapat menggunakan penjerap selulosa, atau penjerap lainnya. Kecepatan KLT disebabkan oleh sifat penjerap yang lebih padat jika disapukan pada pelat, dan akan lebih baik untuk senyawa yang tidak stabil. Kepekaan KLT yaitu dapat digunakan untuk jumlah sampel yang sedikit atau dalam ukuran mikro (Harborne, 1987).

2.7.2. Spektroskopi Infra Merah

Spektrum inframerah suatu molekul adalah hasil transisi antara tingkat energi getaran (vibrasi) yang berlainan. Inti-inti atom yang terikat oleh ikatan kovalen mengalami getaran (vibrasi) atau osilasi. Bila molekul menyerap radiasi inframerah, energi yang diserap menyebabkan kenaikan dalam amplitudo getaran atom-atom yang terikat. Sehingga dapat dikatakan molekul ini berada dalam keadaan vibrasi tereksitasi, energi yang diserap ini akan dibuang dalam bentuk panas bila molekul itu kembali kepada keadaan dasar (Supratman, 2010).

Panjang gelombang dari absorpsi oleh suatu ikatan, bergantung pada macam getaran dari ikatan tersebut. Oleh karena itu, tipe ikatan yang berlainan (C-H, CC, C=O, C=C,O-H, dan sebagainya menyerap radiasi inframerah pada panjang gelombang yang berlainan. Dengan demikian spektrometer inframerah dapat digunakan untuk mengidentifikasi adanya gugus fungsi dalam suatu molekul. (Supratman, 2010). Vibrasi yang informatif untuk tujuan elusidasi struktur adalah pada daerah antara bilangan gelombang 4000 cm^{-1} hingga 400

cm⁻¹ (Kosela, 2010).

Besarnya bilangan gelombang bergantung pada kekuatan ikatan dan massa atom yang melakukan ikatan kimia. Cahaya yang diserap oleh molekul diterjemahkan ke dalam sebuah kurva spektrum infra merah dengan absis berupa bilangan gelombang dan ordinat berupa intensitas serapan. Hal yang perlu diperhatikan dalam menginterpretasi kurva serapan inframerah adalah bilangan gelombang, bentuk kurva serapan (sempit tajam atau melebar) dan intensitas serapan (kuat, sedang, atau lemah) (Kosela, 2010)

2.7.3. Spektroskopi Massa

Spektroskopi massa adalah suatu instrumen yang dapat menyeleksi molekul-molekul gas bermuatan berdasarkan massa atau beratnya. Umumnya spektrum massa diperoleh dengan mengubah senyawa suatu sampel menjadi ion-ion yang bergerak cepat yang dipisahkan berdasarkan perbandingan massa terhadap muatan. Proses ionisasi menghasilkan partikel-partikel bermuatan positif, dimana massa terdistribusi adalah spesifik terhadap senyawa induk (Silverstein, Webster, & Kiemble, 2005).

Pada spektrometer ini, suatu sampel dalam keadaan gas ditabrak atau ditembak dengan elektron berenergi tinggi. Penembakan tersebut menyebabkan lepasnya sebuah elektron dari molekul sampel dan membentuk suatu ion organik. Ion yang dihasilkan oleh penembakan elektron berenergi tersebut tidak stabil dan pecah menjadi fragmen kecil, baik berbentuk radikal bebas maupun ion-ion lain. Dalam sebuah spektrometer massa yang khas, fragmen yang bermuatan positif akan dideteksi. Spektrum massa merupakan alur kelimpahan (*abundance*) jumlah relatif fragmen bermuatan positif berlainan terhadap massa per muatan (m/z atau m/e) dari fragmen-fragmen tersebut. Muatan ion dari sampel yang dideteksi dalam suatu spektrometer massa adalah +1, maka nilai m/z sama dengan massa molekulnya (M) (Supratman, 2010).

2.7.4. Spektroskopi Resonansi Magnetik Inti

Resonansi Magnetik Inti (RMI) merupakan salah satu jenis spektrometri

serapan, seperti halnya spektrometri inframerah dan ultraviolet. Dibawah kondisi yang sesuai dalam medan magnet, sampel dapat mengabsorpsi radiasi elektromagnetik daerah frekuensi radio pada frekuensi yang ditentukan oleh karakteristik sampel. Absorpsi merupakan fungsi dari inti dalam molekul. Spektrum RMI merupakan plot dari frekuensi puncak absorpsi terhadap intensitas puncak. Semua inti membawa muatan (Silverstein, Webster dan Kiemle, 2005). Inti-inti atom tertentu seperti ^1H , ^{13}C , ^{19}F , dan ^{31}P dapat berperilaku sebagai magnet batang kecil. Sifat tersebut mendasari prinsip resonansi magnetik inti sebagai alat analisis dengan tujuan elusidasi struktur. Atom hidrogen memiliki beberapa isotop yaitu ^2H (Deuterium) dan ^3H (Tritium) namun kelimpahan terbesar di alam adalah ^1H sebesar 99,985% (Kosela, 2010).

Interpretasi spektrum ^1H RMI berdasarkan pada tiga informasi yang saling terkait, yakni integrasi sinyal puncak, pergeseran kimia dan spin-spin coupling. Integrasi sinyal puncak memberikan informasi rasio atom hidrogen dalam senyawa. Konsep pergeseran kimia menghubungkan posisi sinyal pada spektrum dengan lingkungan kimia. Terbentuknya sinyal terjadi karena perbedaan lingkungan kimia dari atom hidrogen. Perbedaan kedudukan tersebut akan memberikan frekuensi resonansi yang berbeda. Semakin kecil frekuensi resonansinya, makin besar kerapatan elektronnya, makin kecil pula pergeseran kimia proton tersebut. Sebaliknya semakin besar frekuensi resonansinya, makin kecil kerapatan elektronnya, makin besar pergeseran kimia proton tersebut. Adapun faktor yang mempengaruhi pergeseran kimia ialah faktor induktif, faktor anisotropik, faktor sterik, ikatan hidrogen, dan pelarut yang dipakai (Silverstein, Webster dan Kiemle, 2005).

2.8. Uji Sitotoksitas

Uji sitotoksitas adalah evaluasi yang telah terstandarisasi untuk menentukan apakah suatu material mengandung bahan yang berbahaya (toksik) secara biologis. Pengujian ini tidak hanya dilakukan pada obat anti kanker, namun juga pada bahan tambahan makanan, bahan kosmetik, serta obat-obatan yang lain. Syarat yang harus dipenuhi untuk sistem uji sitotoksitas diantaranya adalah

sistem pengujian harus dapat menghasilkan kurva-dosis respon yang reproduibel dengan variabilitas yang rendah, kriteria respon harus menunjukkan hubungan linier dengan jumlah sel serta informasi yang didapat dari kurva dosis.

Salah satu metode yang umum digunakan untuk menetapkan jumlah sel adalah metode MTT. Prinsip dari metode MTT adalah terjadinya reduksi garam kuningtetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolium bromid) oleh sistem reduktase. Suksinat tetrazolium yang termasuk dalam rantai respirasi dalam mitokondria sel-sel yang hidup membentuk kristal formazan berwarna ungu dan tidak larut dalam air. Penambahan reagen stopper (bersifat detergenik) akan melarutkan kristal berwarna ini yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan ELISA reader. Intensitas warna ungu yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel hidup. Jika intensitas warna ungu semakin besar, maka berarti jumlah sel hidup semakin banyak.

Data yang diperoleh merupakan data absorbansi, yang kemudian digunakan untuk menghitung % inhibisinya dengan mengikuti persamaan berikut :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{rerata OD sel kontrol} - \text{rerata OD}}{\text{Rerata OD sel kontrol}} \times 100 \%$$

Perhitungan laju inhibisi ditentukan dari grafik yang diperoleh dengan memasukkan nilai $y = 50\%$ dan dihitung nilai x nya, maka diperoleh konsentrasi senyawa uji yang menyebabkan laju inhibisi 50 % terhadap sel HCT-116, yang disebut IC_{50} . Suatu zat dikatakan aktif jika memiliki $IC_{50} \leq 100 \mu\text{g/mL}$ (Junaedi dkk, 2008).

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Salemba, Jakarta serta Pusat Penelitian Kimia LIPI, PUSPIPTEK, Serpong, Tangerang Selatan. Penelitian dilaksanakan mulai bulan Januari 2016 sampai dengan bulan Desember 2016.

3.2. Alat

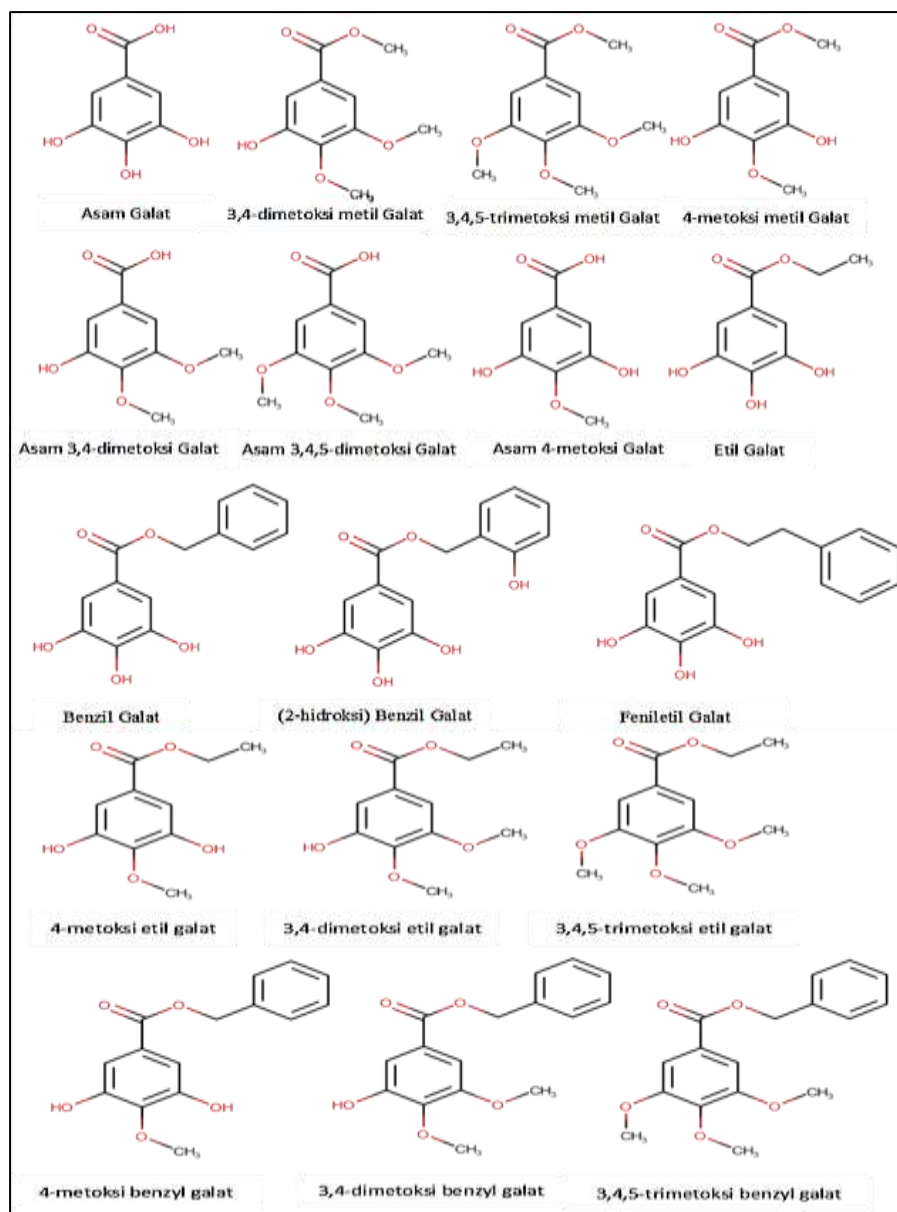
Simulasi *docking* dilakukan menggunakan *personal computer intel Pentium dual core* dengan RAM 2 GB. *Offline software* yang digunakan adalah MarvinSketch 15.5.11, chimera 1.10.2, dan Autodock 4.2. Alat-alat yang digunakan dalam sintesis dan uji sitotoksitas meliputi : spektrofotometer IR (JASCO FT/IR-420 spectrophotometer), lempeng KLT (Merck), Spektroskopi ¹H-NMR (JEOL JNM-ECP500), ¹³C-NMR (JEOL JNM-ECP500), MS (Shimadzu GCMS QP-5000), *Laminar Air Flow* (LAF), lemari asam, lemari pendingin, neraca teknis dan analitis, alat-alat gelas, pipet mikro 100 µl, 1000 µl, pH meter, termometer, pengaduk magnet, kolom silica gel, alat pengumpul fraksi (*fraction collector*), dan sumuran sel *line*.

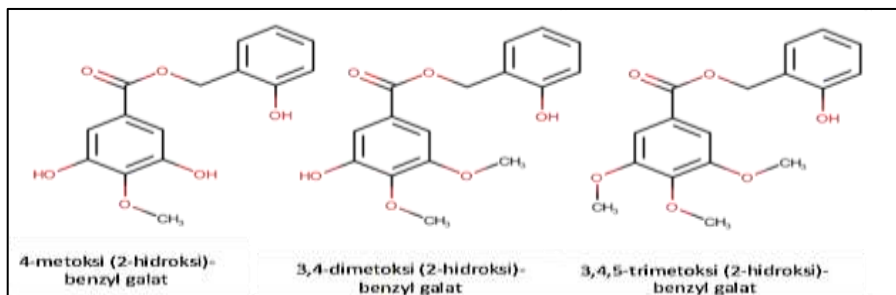
3.3. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian meliputi: Asam galat (Sigma), Tetrahidrofuran (THF) (Wako), Diisopropil Carbodiimide (Sigma), DMAP (N,N-4-dimetilaminopiridin) (Wako), Kalium karbonat (Wako), Metil Iodida (Wako), Etil asetat (EtOAc), Natrium bikarbonat 6 % (NaHCO₃ 6%), NaCl, MgSO₄ anhidrat (Wako), Kloroform (Merck), metanol, Dimetilformamide (Wako), KHSO₄ 1M, larutan jenuh NaCl, LiOH monohidrat (Wako), etanol (Wako), benzil bromida (Wako), salicil alkohol (Wako), MTT (sigma), *cell line* HCT-116 (Lab. Patologi-Anatomi FKUI), aquadest.

3.4. Desain Dua Puluh Struktur Senyawa Derivat Asam Galat

Desain struktur senyawa derivat alkil ester galat adalah memodifikasi struktur asam galat dengan melakukan reaksi esterifikasi pada gugus karbonil asam galat dengan senyawa alkil alkohol. Senyawa derivat yang dihasilkan adalah etil galat, benzil galat, 2-hidroksi benzil galat dan feniletal galat. Selanjutnya, untuk mempelajari apakah penggantian gugus hidroksi menjadi metoksi akan mempengaruhi aktifitas sitotoksik terhadap sel HCT-116 maka didesain senyawa derivat asam galat berupa 2-hidroksi benzil galat menjadi 4-metoksi 2-hidroksi benzil galat. Desain dua puluh senyawa derivat asam galat dapat dilihat pada gambar 3.1.





Gambar 3.1 Desain 20 Senyawa Derivat Asam Galat

3.5. Cara Kerja

3.5.1. Simulasi *Docking*

Simulasi docking terdiri dari empat tahap. Tahap pertama adalah preparasi struktur makromolekul target yang mencakup pencarian dan pengunduhan, optimasi dan pemisahan dari residu nonstandard. Struktur makromolekul target dicari dan diunduh dari web PDB dengan kode 5C9C.pdb untuk protein BRAF. Selanjutnya dilakukan optimasi dengan menggunakan UCSF Chimera berupa pemisahan dengan ligand asal, dan penghapusan residu nonstandard. Setelah itu, dilakukan *prepdock*, dan berkas file disimpan dalam format .mol2 atau .pdb. Kemudian dirubah menjadi format .pdbqt menggunakan software autodock 4.2.

Tahap kedua yaitu preparasi ligan yang mencakup pembuatan struktur dua dimensi, perubahan struktur menjadi tiga dimensi, serta penambahan atom hidrogen dan energi *gasteiger*. Struktur dua dimensi derivat asam galat yang telah didesain dibuat menggunakan program MarvinSketch 15.5.11. Kemudian struktur dua dimensi derivat asam galat dirubah menjadi tiga dimensi menggunakan program Marvin Space dan berkas file disimpan dalam format .mol. Penambahan atom hidrogen dan energi *gasteiger* terhadap ligan menggunakan software UCSF Chimera 1.10.2. Selanjutnya berkas file ligan disimpan dalam format .pdb atau .mol2. Untuk perubahan format menjadi .pdbqt menggunakan software autodock 4.2.

Tahap ketiga yang dilakukan adalah pembuatan berkas Grid Parameter File (GPF) dan *Docking* Parameter File (DPF) kompleks makromolekul dengan ligan menggunakan software Autodock 4.2. Selanjutnya proses simulasi *docking* antara makromolekul dengan ligan dijalankan

menggunakan program “*command prompt*” menghasilkan berkas dengan format *.glg untuk file GPF dan *.dlg untuk file DPF.

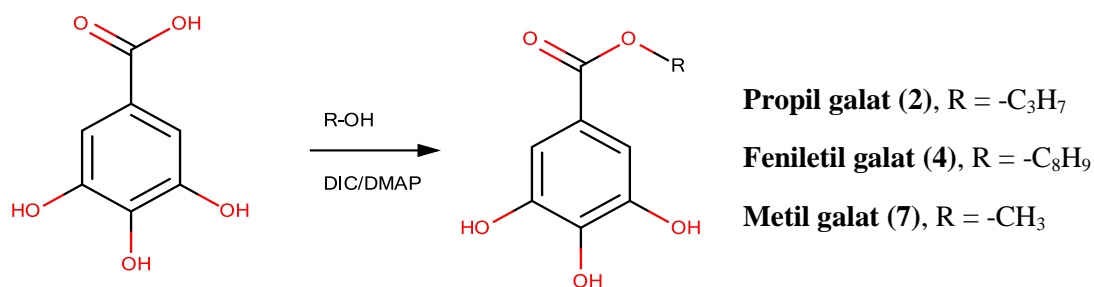
Tahap keempat untuk simulasi docking ini adalah analisis hasil docking yang berupa berkas dengan format *.dlg. Proses ini menghasilkan data *binding energy* antara satu ligan dengan makromolekul BRAF. Dari 20 kompleks antara ligan dengan protein BRAF, dipilih empat yang memberikan *binding energy* terkecil untuk disintesis.

3.5.2. Jalur dan Prosedur Sintesis Derivat Asam Galat (Wang, 2010)

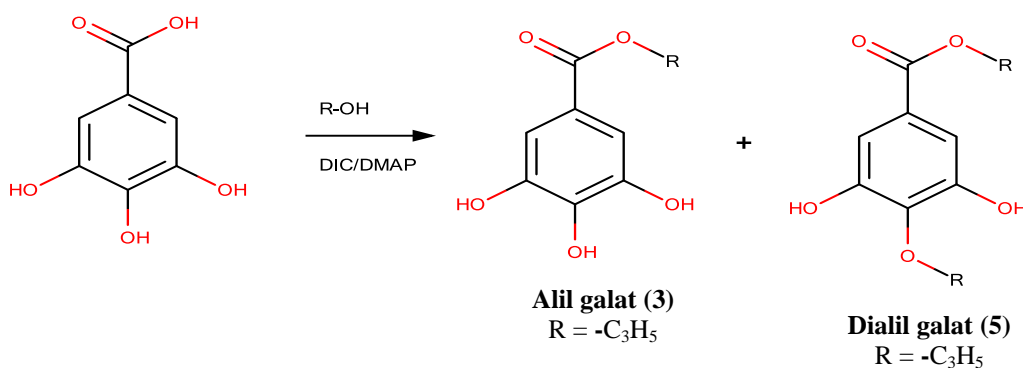
Pada Penelitian ini, sebelum dilakukan sintesis dilakukan tahap penambatan molekul, sehingga dari 20 senyawa turunan asam galat yang telah didesain, lima yang akan disintesis belum diketahui. Jalur dan prosedur sintesis dalam proposal ini dibuat secara umum untuk ke-20 senyawa derivat asam galat. Secara garis besar jalurnya terbagi menjadi tiga kelompok yaitu kelompok senyawa yang disintesis dengan satu tahap esterifikasi, satu tahap metilasi dan kelompok yang jalur sintesisnya adalah 3 tahap yaitu metilasi, hidrolisis metil ester dilanjutkan esterifikasi.

3.5.2.1. Jalur dan Prosedur Umum Sintesis Derivat Alkil Ester Galat (Senyawa 2, 4, 1, 3 dan 5)

Jalur sintesis senyawa derivat asam galat, senyawa **2**, **4**, dan **15**, disajikan pada gambar 3.1. Esterifikasi asam galat dengan propanol, feniletal alkohol dan metanol dengan menggunakan kombinasi DIC/DMAP akan memberikan produk alkil ester galat berturut-turut adalah propil galat (2), feniletal galat (4), dan metil galat (1). Sedangkan esterifikasi asam galat dengan alil alkohol berlebih menggunakan kombinasi DIC/DMAP akan memberikan produk alil galat (3) sebagai produk utama dan dialil galat (5) sebagai produk samping (gambar 3.2).



Gambar 3.2 Jalur sintesis senyawa derivat asam galat 2, 4 dan 7



Gambar 3.3 Jalur sintesis senyawa 3 (produk utama) dan 5 (produk samping)

Sintesis derivat asam galat (alkil ester galat) dilakukan dengan mereaksikan asam galat dengan senyawa alkohol. Asam galat dan senyawa alkohol dilarutkan dalam pelarut Tetrahidrofuran (THF), kemudian ditambahkan aktivator DIC (Diisopropil Carbodiimide) dan katalis DMAP (N,N-Dimetil amino piridin). Reaksi dilaksanakan pada suhu ruang, sambil diaduk dengan pengaduk magnetik pada kecepatan putar tetap. Pada akhir reaksi, ditambahkan air suling, endapan putih DIU (Diisopropil Urea) yang terbentuk sebagai hasil samping penggunaan DIC, disaring dengan kertas saring whatman No. 42. Filtrat yang didapat diekstraksi dengan kloroform sebanyak tiga kali. Fasa organik (kloroform) dikumpulkan, selanjutnya ditambahkan Na_2SO_4 anhidrat untuk menarik air yang masih ada di fasa organik, kemudian disaring. Fasa organik yang diperoleh dianalisis dengan KLT menggunakan fasa gerak kloroform-metanol. Selanjutnya fasa organik dipekatkan dengan penguap putar. Pekatan (ekstrak kasar) kemudian dimurnikan dengan kromatografi kolom silika gel. Fraksi-fraksi yang

mengandung noda dominan dan tunggal dikumpulkan, dan pelarutnya diuapkan dengan pelarut putar. Selanjutnya, senyawa murni yang diperoleh diidentifikasi dengan spektrometer NMR dan spektrometer massa.

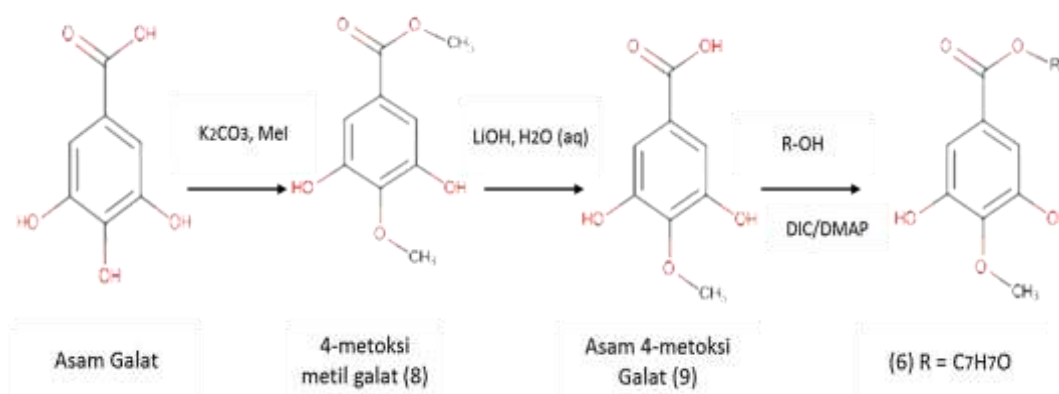
3.5.2.2. Jalur dan Prosedur Umum Sintesis Derivat Alkil Ester Galat dan Senyawa Antara (Senyawa 6 dan 8-9)

Jalur sintesis senyawa derivat asam galat 6 melalui pembentukan senyawa antara 8-9 ditampilkan pada gambar 3.3. Derivat ester galat, senyawa 6, dapat disiapkan melalui tiga tahap reaksi kimia. Pada reaksi tahap pertama, metilasi asam galat dengan K_2CO_3 dan metil iodida (MeI) berlebih akan menghasilkan campuran produk 4-monometoksi metil galat (8). Pada tahap reaksi kedua, hidrolisis metil ester (8) dengan aqueous LiOH monohidrat akan menghasilkan asam 4-monometoksi galat (9). Selanjutnya, pada tahap reaksi ketiga, esterifikasi asam 4-monometoksi galat (9), dengan salicil alkohol menghasilkan senyawa target 4-metoksi (2-hidroksi)-benzil galat (6).

Prosedur metilasi asam galat. Ke dalam larutan asam galat (3 g, 1,175 mmol) dan K_2CO_3 (6.06 g, 2,94 mmol) dalam 25 mL DMF, ditambahkan MeI berlebih (2,41 mL, 2,58 mmol). Campuran diaduk pada suhu ruang selama 41 jam. Campuran reaksi kemudian diencerkan dengan 75 mL EtOAc, lalu dicuci berturut-turut dengan 50 mL H_2O , 50 mL larutan $NaHCO_3$ 6%, 25 mL H_2O , dan 25 mL larutan NaCl 5M. Ekstrak EtOAc lalu dikeringkan dengan $MgSO_4$ anhidrat, disaring, dan dipekatkan. Selanjutnya, ekstrak kasar di murnikan dengan kolom kromatografi silika gel, dengan perbandingan fasa gerak $CHCl_3$: MeOH = 25:1 hingga 6:1 (gradien elusi), memberikan produk monometoksi metilbenzoat, dimetoksi metilbenzoat, dan trimetoksi metil benzoat yang digunakan untuk reaksi hidrolisis berikutnya.

Prosedur hidrolisis ester metil benzoat. Pada reaksi hidrolisis, LiOH monohidrat 0,5 M ditambahkan ke dalam masing-masing larutan metoksi metilbenzoat, dimetoksi metilbenzoat dan trimetoksi metilbenzoat dalam campuran pelarut THF- CH_3OH (1,5 : 0,5 mL). Campuran reaksi diaduk pada suhu kamar selama 18 jam, lalu diasamkan dengan $KHSO_4$ 1M hingga pH = 3,

diencerkan dengan H₂O, dan diekstraksi dengan etilasetat. Fasa etilasetat dikumpulkan, kemudian dicuci dengan air dan larutan jenuh NaCl, lalu dikeringkan dengan MgSO₄ anhidrat, disaring dan diuapkan, menghasilkan masing-masing senyawa asam 4-metoksi-3,5-dihidroksibenzoat berupa padatan putih, senyawa asam 3,4-metoksi-5-dihidroksibenzoat berupa padatan putih dan senyawa asam 3,4,5-trimetoksi benzoat berupa padatan putih. Reaksi esterifikasi selanjutnya sama dengan prosedur umum sintesis derivat alkil ester galat sebelumnya.



Gambar 3.4 Jalur Sintesis Derivat Alkil Ester Galat (Senyawa 6) dan Senyawa Antara (Senyawa 8-9)

3.5.3. Prosedur Karakterisasi Senyawa Hasil Sintesis

Analisis dan karakterisasi senyawa hasil sintesis dapat menggunakan beberapa instrumen berupa FT-IR, spektrometer massa, ¹H NMR dan ¹³C NMR. Masing-masing instrumen menghasilkan spektrum dengan karakter yang khas. Spektrum FT-IR memberikan serapan yang khas untuk beberapa gugus fungsi yaitu gugus karbonil (C=O) pada daerah 1640-1820 cm⁻¹ dengan intensitas kuat yang terbagi kedalam beberapa gugus fungsi diantaranya keton, aldehyd, ester dan asam karboksilat; gugus OH (3200-3600 cm⁻¹), gugus aromatis (C-H :3050-3150 cm⁻¹, C=C : 1475 dan 1600 cm⁻¹) dan lain-lain. Spektrum massa dipaparkan sebagai grafik batang. Setiap puncak dalam spektrum menyatakan suatu fragmen molekul. Puncak tertinggi spektrum disebut puncak dasar (*base peak*) dengan intensitas 100%, dan selanjutnya puncak-puncak kecil dengan intensitas

20%, 30%, tergantung nilai relatifnya terhadap puncak dasar. Spektrum massa juga memberikan informasi tentang bobot molekul yang dianalisis (Supratman, 2010).

Spektrum ^1H NMR memiliki rentang pergeseran kimia dalam senyawa organik yaitu grup metil (0,8-1,2 ppm), grup metilena (1,0-1,5 ppm), grup metin (1,2-1,8 ppm), proton heterosiklik dan aromatik (6-9 ppm), dan proton aldehyd (9-10 ppm) dengan berbagai pola splitting misalnya singlet, doublet, triplet, kuartet, quintet, multiplet dan lainnya. Sedangkan spektrum ^{13}C NMR memiliki rentang pergeseran kimia dalam senyawa organik adalah CH_3 (0-30 ppm), CH_2 (20-45 ppm), CH (30-60 ppm), C kuartener (30-50 ppm), C aromatik (110-155), $\text{C}=\text{O}$ ester, asil halida, amida asam karboksilat (155-185 ppm) dan $\text{C}=\text{O}$ aldehyd, keton (185-225 ppm) (Field *et al*, 1998)

3.5.4. Uji Sitotoksisitas Dengan Metode MTT

Sel HCT-116 dengan konsentrasi $7,2 \times 10^6$ sel/ml sebanyak 100 μL didistribusikan ke dalam plate 96 sumuran dan diinkubasi selama 24 jam untuk beradaptasi dan menempel di sumuran. Keesokan harinya media dibuang kemudian ditambahkan 100 μL media kultur yang mengandung sampel dengan berbagai konsentrasi asam galat ataupun derivatnya (seri konsentrasinya 3,125 $\mu\text{g/mL}$, 6,25 $\mu\text{g/mL}$, 12,5 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$) dan diinkubasi 24 jam. Hari berikutnya, media dibuang, dicuci dengan PBS dan ditambahkan reagen MTT 100 μL ke setiap sumuran, dan diinkubasi selama 2-4 jam sampai terbentuk kristal formazan. Media dibuang kemudian diberikan penambahan reagen stopper DMSO sebanyak 100 μL ke setiap sumuran. Kemudian diukur absorbansi sampel dengan ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm. Data yang diperoleh merupakan data absorbansi, yang kemudian digunakan untuk menghitung % inhibisinya dengan mengikuti persamaan berikut :

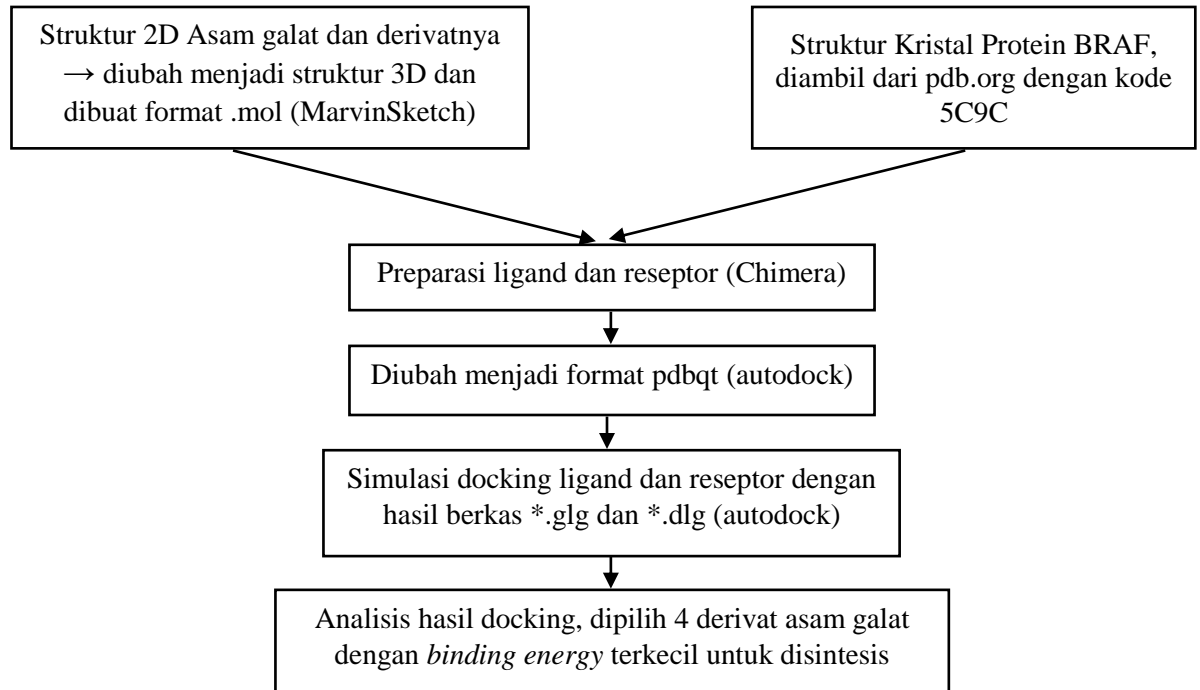
$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{rerata OD sel kontrol} - \text{rerata OD sampel}}{\text{Rerata OD sel kontrol}} \times 100 \%$$

Dari perhitungan regresi linier yang diperoleh kemudian memasukkan nilai $y = 50\%$ dan dihitung nilai x nya, maka diperoleh konsentrasi senyawa uji

yang menunjukkan penghambatan sel sebesar 50 % terhadap sel HCT-116 dan didapat nilai IC_{50} .

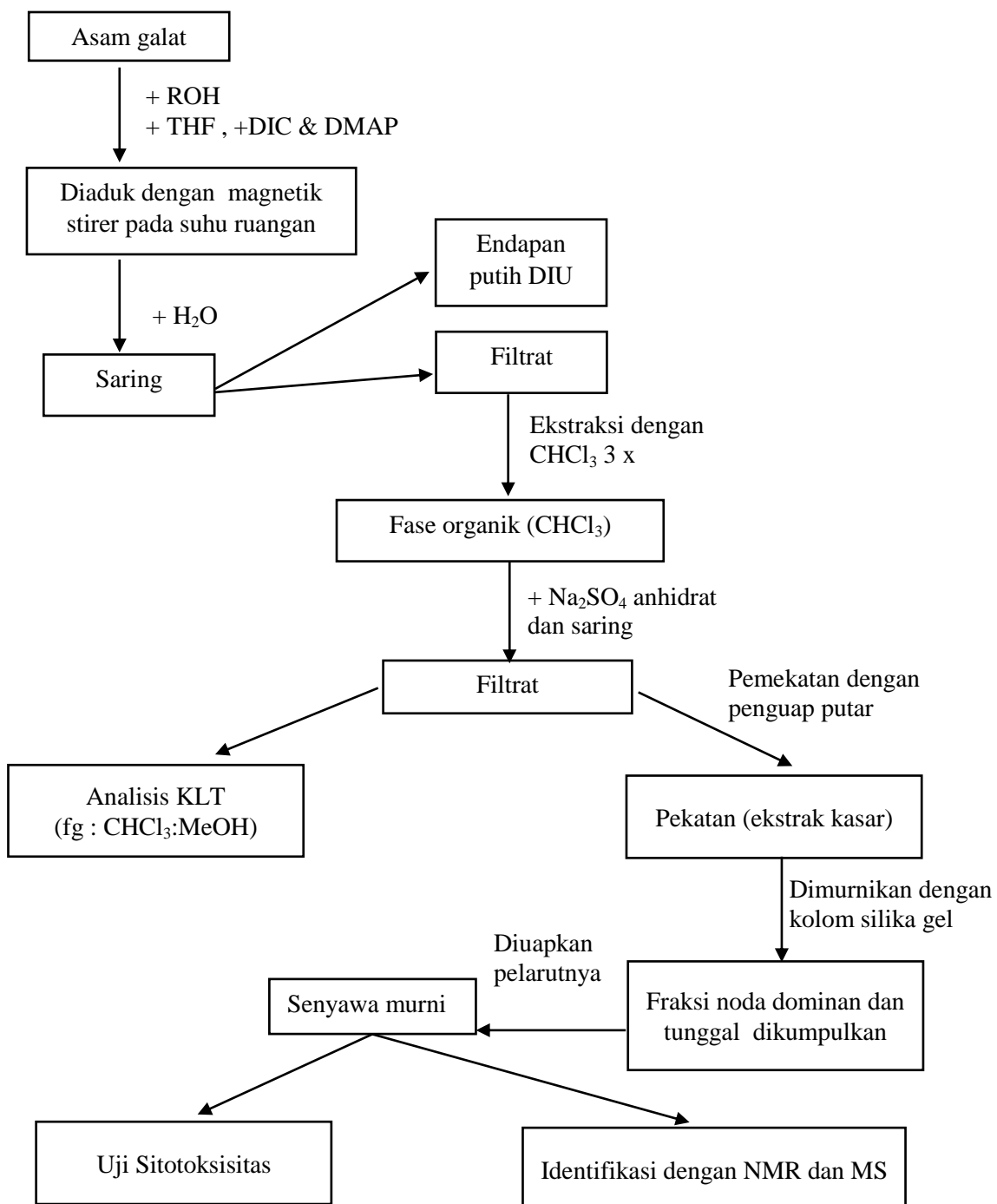
3.6. Bagan Alir Penelitian

3.6.1. Simulasi Docking



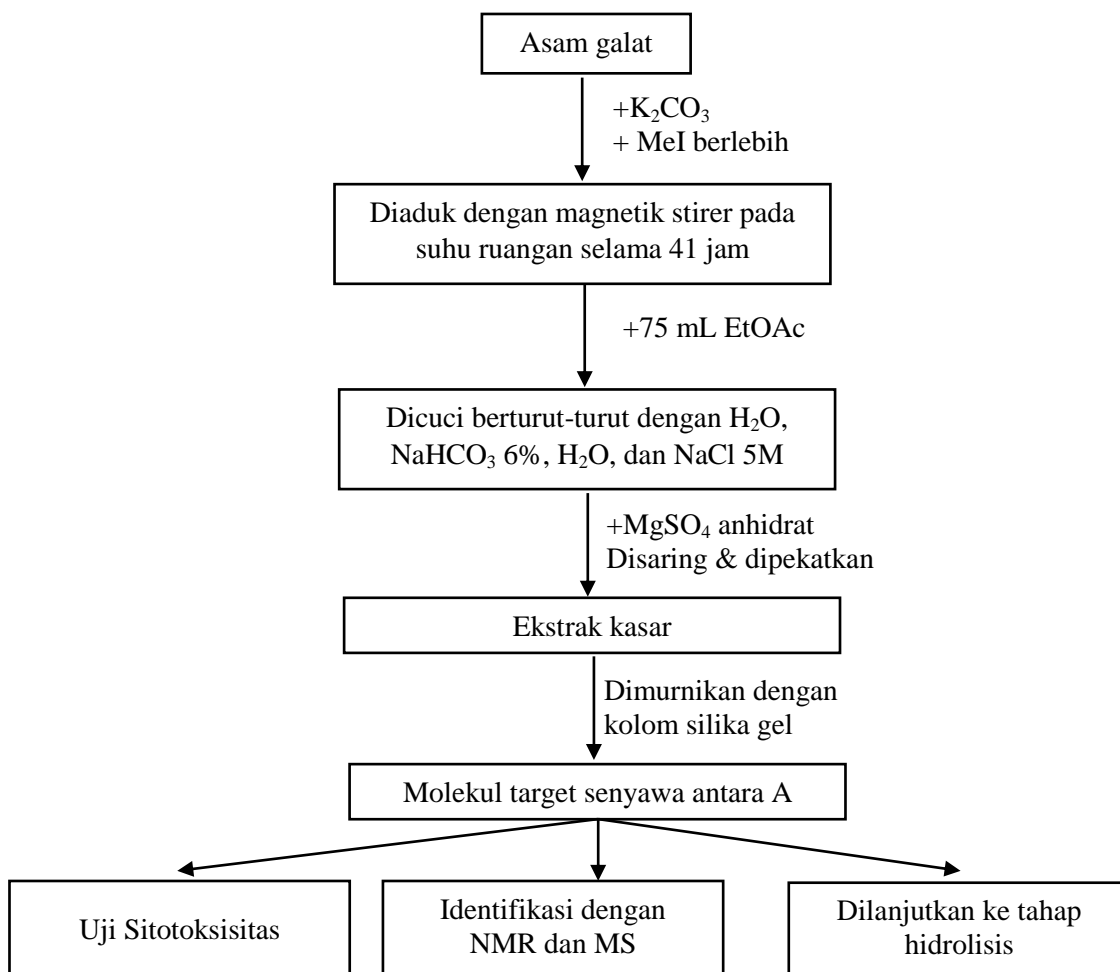
Gambar 3.5 Skema Simulasi Docking

3.6.2. Sintesis Senyawa Derivat Asam Galat Dengan Esterifikasi



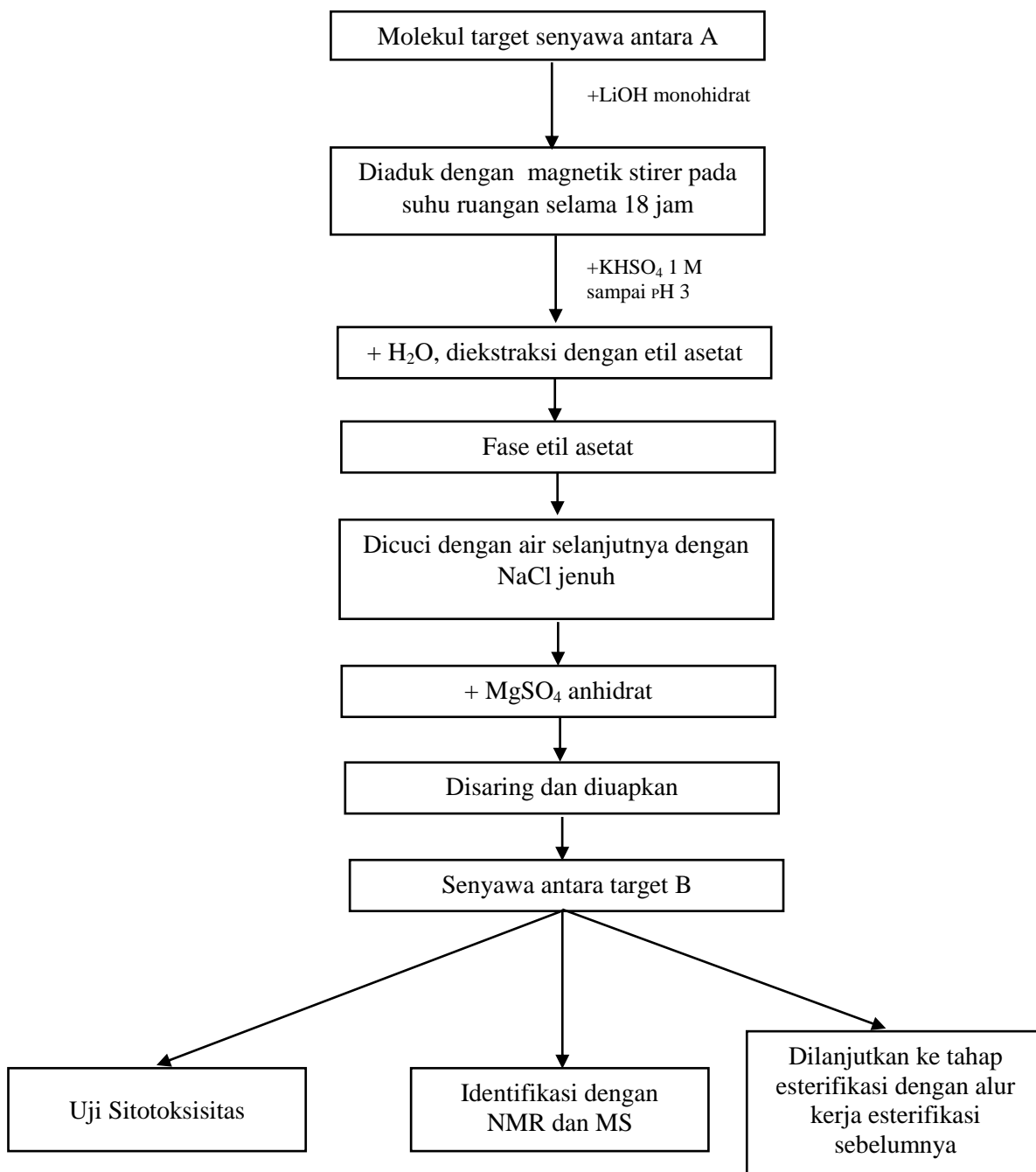
Gambar 3.6 Skema Sintesis Senyawa Derivat Asam Galat dengan Esterifikasi

3.6.3. Sintesis Senyawa Derivat Asam Galat Dengan Metilasi



Gambar 3.7 Skema Sintesis Senyawa Derivat Asam Galat dengan Metilasi

3.6.4. Sintesis Senyawa Derivat Asam Galat Dengan Hidrolisis Produk Metilasi Sebelumnya



Gambar 3.8 Skema Sintesis Senyawa Derivat Asam Galat dengan Hidrolisis Produk Metilasi sebelumnya

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Simulasi Docking

Studi docking dilakukan untuk mengevaluasi efek dari ligan terhadap makromolekul BRAF. Energi Gibbs mencerminkan interaksi energi antara kompleks ligan-protein dan yang memiliki energi paling rendah menunjukkan interaksi yang lebih stabil. Hasil simulasi docking untuk dua puluh senyawa derivat asam galat dan ligan pembanding (obat antikanker) dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Nilai Energi Gibbs (kkal/mol) Asam Galat, Derivatnya, dan Cetuximab

No	Nama Senyawa	Energi Gibbs (ΔG) (kkal/mol)
1	Asam galat	-4,65
2	Etil galat	-5,14
3	4-metoksi etil galat	-5,01
4	3,4-dimetoksi etil galat	-5,27
5	3,4,5-trimetoksi etil galat	-5,43
6	4-metoksi metil galat	-5,10
7	3,4-dimetoksi metil galat	-5,05
8	3,4,5-trimetoksi metil galat	-5,18
9	Asam 4-metoksi galat	-5,00
10	Asam 3,4-dimetoksi galat	-4,95
11	Asam 3,4,5-trimetoksi galat	-4,99
12	Benzil galat	-7,36
13	(2-hidroksi) benzil galat	-7,63
14	4-metoksi benzil galat	-6,80
15	3,4-dimetoksi benzil galat	-6,99
16	3,4,5-trimetoksi benzil galat	-6,81
17	4-metoksi-(2-hidroksi) benzil galat	-7,18
18	3,4-dimetoksi-(2-hidroksi) benzil galat	-7,00
19	3,4,5-trimetoksi-(2-hidroksi) benzil galat	-6,64
20	Feniletal galat	-7,47
21	Cetuximab	-6,83

Data simulasi docking tabel 4.1 menunjukkan bahwa dari dua puluh senyawa, terdapat empat derivat asam galat dengan nilai ΔG yang paling rendah yaitu benzil galat (12), (2-hidroksi) benzil galat (13), 4-metoksi-(2-hidroksi) benzil galat (17) dan feniletal galat (20) yang memiliki potensi cukup baik

terhadap penghambatan BRAF sebagai antiproliferasi dan induksi apoptosis. Senyawa derivat yang memiliki potensial terbesar sebagai inhibitor BRAF adalah (2-hidroksi) benzil galat (-7,63). Selain ΔG , indikator lain hasil simulasi docking yang menunjukkan standar inhibitor antara kompleks ligan-protein adalah kontanta inhibisi (K_i) dan jumlah ikatan hidrogen dapat dilihat pada tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil simulasi docking ligan uji dan ligan pembanding pada BRAF

Senyawa	K_i (μM)	ΣIH	cLogP	BM	Residu Terdekat
Asam galat (1)	389,42	3	0,70	170,12	Val ₄₇₀ , Ala ₄₈₀ , Val ₄₈₁ , Lys ₄₈₂ , Glu ₅₀₀ , Leu ₅₀₄ , Ile ₅₂₆ , Val ₅₂₇ , Thr ₅₂₈ , Asp ₅₉₃
Etil galat (2)	170,87	2	1,68	198,05	Ala ₄₈₀ , Val ₄₈₁ , Lys ₄₈₂ , Glu ₅₀₀ , Leu ₅₀₄ , Leu ₅₁₃ , Ile ₅₂₆ , Thr ₅₂₈ , Gln ₅₂₉ , Asp ₅₉₃
Benzil galat (12)	4,03	3	3,12	260,06	Val ₄₇₀ , Ala ₄₈₀ , Val ₄₈₁ , Lys ₄₈₂ , Glu ₅₀₀ , Leu ₅₀₄ , Thr ₅₂₈ , Gln ₅₂₉ , Trp ₅₃₀ , Cys ₅₃₁ , Asp ₅₉₃
(2-hidroksi) benzil galat (13)	2,57	4	2,83	276,23	Val ₄₇₀ , Ala ₄₈₀ , Val ₄₈₁ , Lys ₄₈₂ , Glu ₅₀₀ , Leu ₅₁₃ , Thr ₅₂₈ , Gln ₅₂₉ , Trp ₅₃₀ , Cys ₅₃₁ , Asp ₅₉₃ , Phe ₅₉₄ , Gln ₅₉₅
4-metoksi (2-hidroksi) benzil galat (17)	5,54	4	2,86	290,07	Val ₄₇₀ , Ala ₄₈₀ , Lys ₄₈₂ , Glu ₅₀₀ , Leu ₅₀₄ , Leu ₅₁₃ , Thr ₅₂₈ , Gln ₅₂₉ , Trp ₅₃₀ , Cys ₅₃₁ , Gly ₅₉₂ , Asp ₅₉₃ , Phe ₅₉₄
Feniletal galat (20)	3,81	3	3,37	274,08	Val ₄₇₀ , Ala ₄₈₀ , Val ₄₈₁ , Lys ₄₈₂ , Leu ₅₁₃ , Ile ₅₂₆ , Thr ₅₂₈ , Gln ₅₂₉ , Trp ₅₃₀ , Cys ₅₃₁ , Asp ₅₉₃ , Phe ₅₉₄
Cetuximab	9,89	1	3,78	273,37	Ile ₄₆₂ , Val ₄₇₀ , Ala ₄₈₀ , Lys ₄₈₂ , Thr ₅₂₈ , Trp ₅₃₀ , Cys ₅₃₁ ,

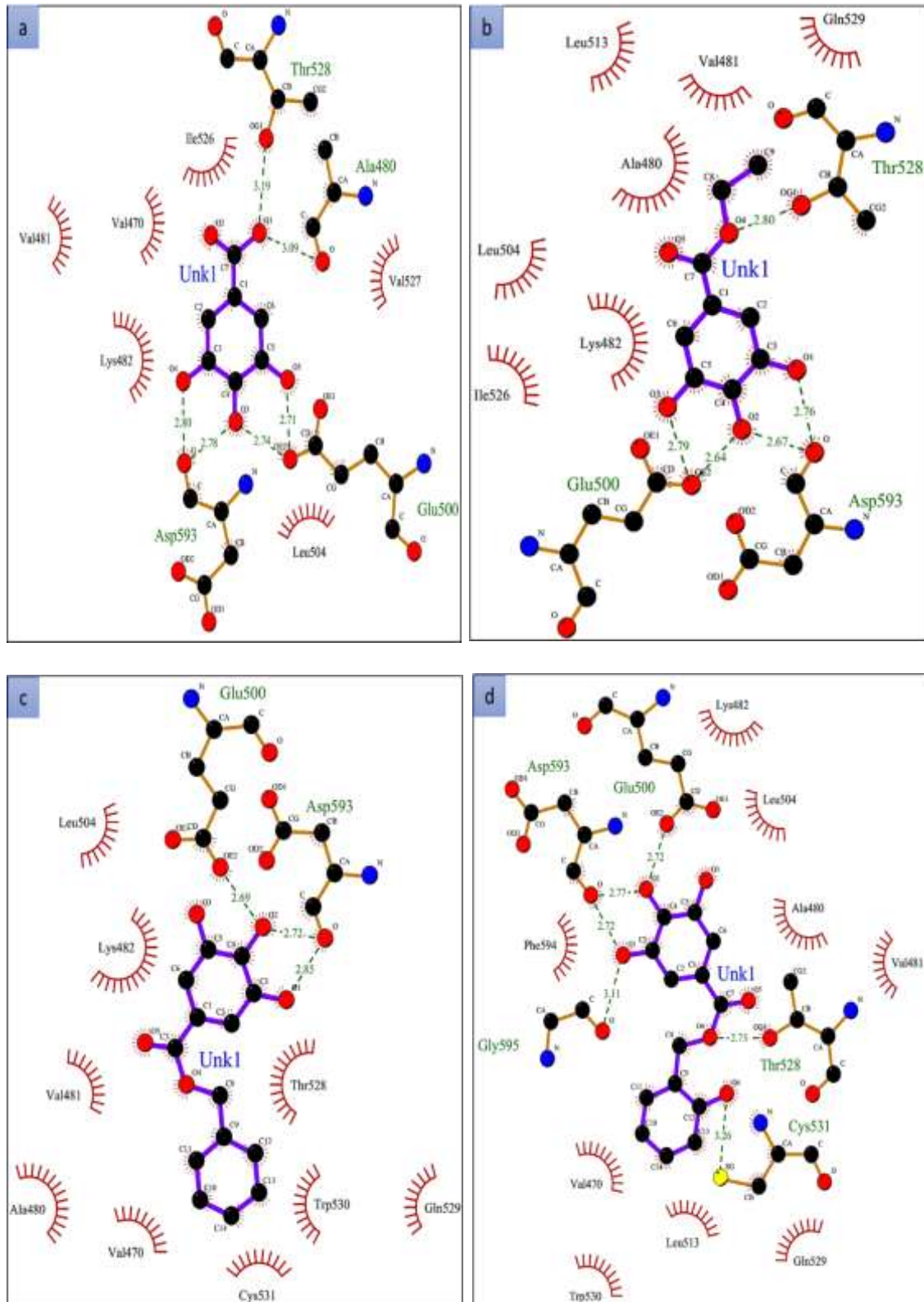
					Asp ₅₉₃ , Phe ₅₉₄
--	--	--	--	--	---

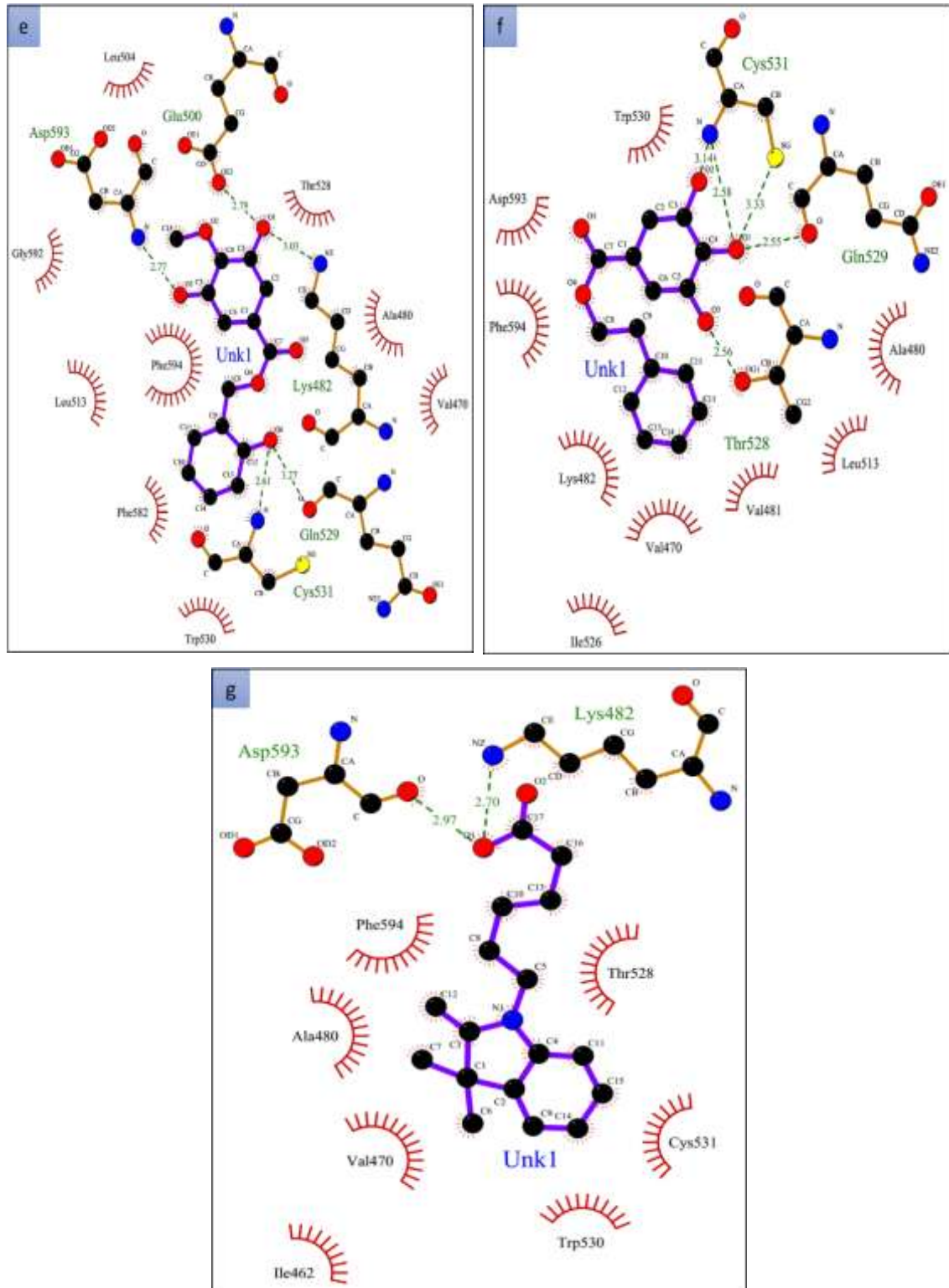
Ki (konstanta inhibisi), Σ IH (jumlah ikatan hidrogen), cLogP (lipofilisitas), BM (berat molekul)

Indikator simulasi *docking* yang baik dapat dilihat dengan membandingkan nilai energi Gibbs (ΔG), tetapan inhibisi, dan jumlah interaksi hidrogen sebagai standar inhibitor. Ikatan pembentukan kompleks yang kuat ditandai dengan nilai ΔG yang rendah, tetapan inhibisi rendah, dan banyaknya jumlah interaksi hidrogen. Berdasarkan hasil simulasi *docking* empat senyawa derivat asam galat yaitu (12), (13), (17), dan (20) memiliki kriteria indikator yang cukup baik (berdasarkan tabel 4.1 dan tabel 4.2) yang menunjukkan ikatan kuat antara kompleks ligan-protein sehingga berpotensi sebagai kandidat obat kanker kolon dengan menghambat residu BRAF.

Data tabel 4.2 menunjukkan bahwa berat molekul (<500) dan nilai lipofilisitas (cLogP = <5) untuk senyawa derivat asam galat ini memenuhi kriteria dari Lipinski untuk aspek permeabilitas. Aspek permeabilitas berhubungan dengan kemampuan senyawa menembus membran sel. Hal ini sesuai dengan aturan Lipinski (*Rule of Five*) sebagai syarat senyawa obat memiliki permeabilitas yang baik terhadap membran sel, adalah berat molekul <500, lipofilisitas/koeffisien partisi <5, jumlah donor hidrogen (O-H atau N-H) <5, dan jumlah akseptor hidrogen (O atau N) <5 (Lipinski *et al*, 2001).

Senyawa feniletil galat (20) memiliki nilai cLogP lebih besar dari keempat senyawa hasil simulasi *docking* yaitu sebesar 3,37. Kemungkinan hal tersebut dikarenakan akibat gugus alkil yang lebih panjang dari senyawa yang lainnya, sehingga dapat berdampak pada aspek kelarutan dan permeabilitasnya (Lipinski *et al*, 2000). Senyawa benzil galat (12) memiliki nilai cLogP lebih besar daripada (2-hidroksi) benzil galat (13) yaitu sebesar 3,12 dan 2,83. Tetapi penghambatan senyawa (13) terhadap target molekul BRAF lebih baik. Hal ini mungkin disebabkan gugus hidroksi pada senyawa (13) dapat meningkatkan aktivitas senyawa tersebut. Penelitian Hanafi & Thelma, (1998) melaporkan bahwa penambahan gugus hidroksi pada senyawa dapat meningkatkan aktivitasnya dalam menghambat pertumbuhan sel kanker.





Gambar 4.1 Interaksi BRAF dengan asam galat, derivatnya, serta ligan pembeding; a) asam galat, (b) etil galat, (c) benzil galat, (d) 2-hidroksi benzil galat, (e) 4-metoksi (2-hidroksi) benzil galat, (f) feniletal galat, and (g) cetuximab

Asam-asam amino yang berinteraksi dengan ligan adalah asam amino esensial dan non esensial. Asam amino esensial terdiri atas Val, Lys, Leu, Ile, Thr, Trp, dan phe. Sedangkan yang termasuk asam amino non esensial adalah Ala, Glu, Gln, Gly, dan Cys. Asam-asam amino tersebut berfungsi untuk pertumbuhan, reproduksi dan kesehatan (Wu, 2010). Ikatan yang terjadi antara ligan-ligan dengan residu BRAF adalah ikatan hidrogen yang berikatan dengan asam amino LYS⁴⁸², GLU⁵⁰⁰, LEU⁵¹³, THR⁵²⁸, GLN⁵²⁹, CYS⁵³¹ dan ASP⁵⁹³ dengan jarak <3,5 Å (Tabel 4.2 & Gambar 4.1). Sebagian besar interaksi yang terjadi yaitu dengan asam amino GLU⁵⁰⁰ dan ASP⁵⁹³ yang menunjukkan kestabilan dan ikatan yang sangat solid antara ligan-ligan (asam galat dan derivatnya) dengan residu. Sedangkan untuk ligan pembanding yaitu cetuximab memberikan ikatan hidrogen yang lemah untuk LYS⁴⁸². Penelitian yang dilakukan Yang et al (2011) menunjukkan bahwa asam amino Glu⁵⁰¹, Cys⁵³², and Asp⁵⁹⁴ dengan jarak <3,5 Å memberikan ikatan hidrogen yang sangat kuat dan stabil pada residu BRAF.

4.2. Karakterisasi Sintesis Senyawa Derivat Asam Galat

4.2.1. Sintesis Senyawa Etil Galat

Hasil analisis awal senyawa sintesis menggunakan KLT menunjukkan pemisahan yang baik dengan harga Rf sekitar 0,6. Pemurnian senyawa menggunakan kromatografi kolom dengan tingkat kemurnian >90%. Hal ini didasarkan pada karakterisasi spektrum ¹H NMR dan ¹³C NMR. Yield yang dihasilkan untuk senyawa etil galat sebesar 64,55%.

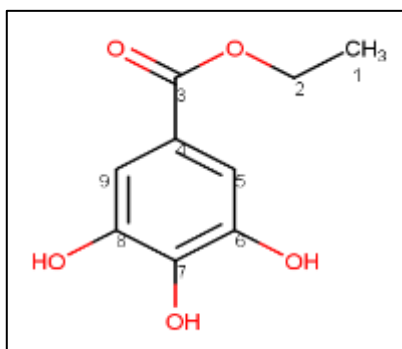
Spektrum FT-IR menunjukkan adanya vibrasi ulur pada serapan 1683 cm⁻¹ untuk gugus karbonil ester (C=O) dan diperkuat dengan pita serapan 1030 untuk gugus C-O ester. Serapan melebar pada daerah 3400 cm⁻¹ menunjukkan adanya gugus OH yang berikatan pada gugus aromatik yang diperkuat dengan pita serapan 1250 cm⁻¹ (-C-OH) dan serapan 1450 cm⁻¹ untuk ikatan rangkap C=C aromatis. Dari dua pita serapan untuk gugus C=O dan OH, kemungkinan besar senyawa ini adalah asam organik.

Analisis MS menunjukkan fragmentasi puncak induk (*parent peak*)

sebesar m/z 198 (lampiran 1). Massa relatif molekul untuk senyawa etil galat ini sesuai dengan massa senyawa hasil sintesis yang ditargetkan dan perhitungan massa secara teori serta software MarvinSketch dengan rumus senyawa $C_9H_{10}O_5$ adalah sebesar 198,0852.

Spektrum 1H NMR etil galat memberikan sinyal pada pergeseran kimia 1,3 ppm (3H, t, $-CH_3$) dengan 3 buah proton berasal dari gugus metil yang mempunyai 2 proton tetangga. Pergeseran kimia 4,2 ppm (2H, q, $-CH_2$) yang terletak pada atom C_2 . Pada daerah 7,1 ppm (1H, s, $-CH$) menunjukkan proton pada gugus aromatis dengan posisi C_5 dan C_9 .

Pergeseran kimia pada spektrum ^{13}C NMR terletak pada daerah 166,6 ppm untuk gugus ester ($C=O$). Pada daerah pergeseran 109,6 ppm menunjukkan posisi C_5 dan C_9 . Pergeseran kimia ikatan ($-C-OH$) yang terikat dengan gugus aromatis ditunjukkan pada daerah 138,5 ppm dan 145,9 ppm untuk posisi C_6 , C_7 dan C_8 . Daerah 60,8 ppm dan 14,6 ppm menunjukkan untuk atom karbon C_2 dan C_1 . Berikut adalah gambar struktur senyawa etil galat (gambar 4.2) dan hasil analisis 1H NMR dan ^{13}C NMR dapat dilihat pada tabel 4.3.



Gambar 4.2 Struktur Etil Galat

Tabel 4.3 Hasil analisis Spektrum 1H NMR dan ^{13}C NMR Senyawa Etil Galat (Lampiran 1)

Posisi	δC (ppm)	δH (ppm)	Multiplisitas	Jumlah atom H
1	14,6	1,3	Triplet (J: 7,4 Hz)	3

2	60,8	4,2	Quartet (J: 6,9 Hz)	2
3	166,6			
4	122			
5	109,6	7,1	Singlet	1
6	145,9			
7	138,5			
8	145,9			
9	109,6	7,1	Singlet	1

4.2.2. Sintesis Senyawa Benzil Galat

Hasil analisis awal senyawa sintesis menggunakan KLT menunjukkan pemisahan yang baik dengan harga R_f sekitar 0,63 dengan komposisi eluen antara CHCl₃ : MeOH (6:1). Pemurnian senyawa menggunakan kromatografi kolom dengan tingkat kemurnian >80%. Hal ini didasarkan pada karakterisasi spektrum ¹H NMR dan ¹³C NMR. Yield yang dihasilkan untuk senyawa benzil galat sebesar 62,11%.

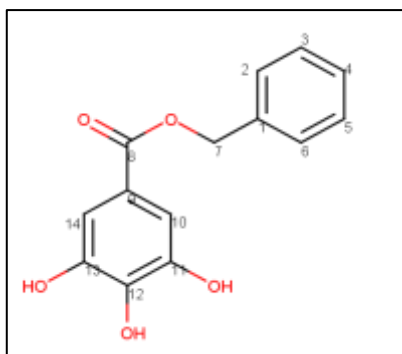
Spektrum FT-IR benzil galat menunjukkan adanya vibrasi ulur pada serapan 1710 cm⁻¹ untuk gugus karbonil ester (-C=O). Adanya gugus ester diperkuat dengan vibrasi ulur pada serapan 1025 cm⁻¹ untuk gugus C-O ester. Pita serapan melebar pada daerah 3400 cm⁻¹ menunjukkan adanya gugus -OH yang dapat membentuk jembatan hidrogen dan diperkuat oleh vibrasi gugus aromatik (-C-OH) dengan pita serapan 1215 cm⁻¹. Pita serapan 1475 cm⁻¹ menunjukkan adanya ikatan rangkap C=C aromatis.

Analisis MS menunjukkan massa relatif molekul senyawa adalah sebesar m/z 260 (lampiran 2). Hal ini sesuai dengan perhitungan massa secara teori dan software MarvinSketch dengan rumus molekul C₁₄H₁₂O₅ untuk senyawa benzil galat dengan massa molekul relatif adalah sebesar 260,0685.

Spektrum ¹H NMR benzil galat memberikan sinyal pada pergeseran kimia 7,4 ppm (1H, m, aromatik) dan 7,5 ppm (1H, m, aromatik) yang menunjukkan empat buah proton pada gugus aromatik berturut-turut pada posisi C₂, C₃, C₅ dan

C₆. Pada daerah 5,3 ppm (2H, s, -CH₂) untuk posisi C₇. Sedangkan pergeseran kimia 7,2 ppm (1H, s, aromatik) untuk posisi C₁₀ dan C₁₄.

Spektrum ¹³C NMR menunjukkan jumlah atom C berjumlah 14 buah. Pergeseran kimia terletak pada daerah 166,6 ppm untuk gugus ester (C=O) dengan posisi C₈. Pada puncak pergeseran 129,2 ppm dan 109,8 ppm adalah atom karbon untuk senyawa aromatik yaitu posisi C₂, C₃, C₅, dan C₆. Sedangkan pada daerah 137,7 ppm menampilkan daerah senyawa aromatik untuk C₁₀ dan C₁₄. Atom karbon yang mengikat gugus hidroksi (-C-OH) ditunjukkan pada pergeseran kimia 138,9 ppm dan 146 ppm yang terikat pada rantai karbon C₁₁, C₁₂, dan C₁₃. Berikut adalah gambar struktur senyawa benzil galat (gambar 4.3) dan hasil analisis ¹H NMR dan ¹³C NMR dapat dilihat pada tabel 4.4.



Gambar 4.3 Struktur Benzil Galat

Tabel 4.4 Hasil Analisis Spektrum ¹H NMR dan ¹³C NMR Senyawa Benzil Galat Galat (Lampiran 2)

Posisi	δ C (ppm)	δ H (ppm)	Multiplisitas	Jumlah atom H
1	128,7			
2	129,2	7,5	Multiplet	2
3	109,8	7,4	Multiplet	2
4	121,5			
5	109,8	7,4	Multiplet	2
6	129,2	7,5	Multiplet	2
7	66,5	5,3	Singlet	2
8	166,6			

9	128,7			
10	137,7	7,2	Singlet	1
11	146			
12	138,9			
13	146			
14	137,7	7,2	Singlet	1

4.2.3. Sintesis Senyawa 2-hidroksi Benzil Galat

Hasil analisis awal senyawa sintesis menggunakan KLT menunjukkan pemisahan yang baik dengan harga Rf sekitar 0,6 dengan komposisi eluen antara CHCl_3 : MeOH (5:1). Pemurnian senyawa menggunakan kromatografi kolom dengan tingkat kemurnian >80%. Hal ini didasarkan pada karakterisasi spektrum ^1H NMR dan ^{13}C NMR. Yield yang dihasilkan untuk senyawa 2-hidroksi benzil galat sebesar 53,25%.

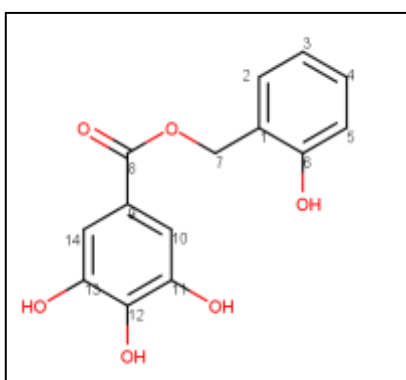
Hasil spektrum FT-IR menunjukkan pita serapan pada daerah 3300 cm^{-1} menunjukkan gugus (-OH) yang dihubungkan dengan vibrasi gugus aromatis (-C-OH) pada daerah serapan 1250 cm^{-1} dan diperkuat untuk pita serapan 1475 cm^{-1} menunjukkan adanya ikatan rangkap C=C aromatis. Vibrasi ulur terjadi pada serapan 1610 untuk gugus karbonil (-C=O) dan didukung oleh pita serapan 1015 cm^{-1} (-C-O) untuk gugus ester.

Analisis MS menunjukkan massa atom relatif yang terdeteksi dengan rumus senyawa $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_6$ adalah sebesar m/z 276,0633 (lampiran 3). Hal ini sesuai dengan perhitungan secara teori dan software MarvinSketch untuk senyawa 2-hidroksi benzil galat adalah 276,0633.

Puncak-puncak pergeseran kimia untuk senyawa ini terjadi pada daerah kimia 6,8 ppm (1H, d, -CH), 6,9 ppm (1H, d, -CH), 7,2 ppm (1H, m, -CH) dan 7,4 ppm (1H, m, -CH) menunjukkan pergeseran empat buah proton pada senyawa aromatis dengan posisi C_3 , C_5 , C_4 dan C_6 . Pergeseran kimia 7,1 ppm (1H, s, -CH) untuk posisi atom C_{10} dan C_{14} pada senyawa aromatis. Pada daerah kimia 5,3 ppm (2H, s, -CH₂) dengan posisi pada atom C_7 .

Pergeseran kimia 166,9 ppm pada spektrum ^{13}C NMR menunjukkan

adanya gugus karbonil ester (C=O) pada posisi C₈. Atom karbon yang mengikat gugus hidroksi ditunjukkan pada daerah kimia 146,1 ppm (2 atom C) dengan posisi C₁₁ dan C₁₃, 156,3 ppm untuk posisi C₁₂ dan 138,8 ppm untuk posisi C₂. Pada daerah pergeseran 130,2 ppm, 138,8 ppm, 121,7 ppm, 120,3 ppm, 123,7 ppm dan 116,2 menunjukkan atom karbon untuk senyawa aromatis untuk posisi C₁-C₆. Sedangkan untuk daerah aromatis lainnya terdapat di daerah 130,7 ppm, 109,8 ppm (2 atom C posisi C₁₀ dan C₁₄) untuk atom karbon C₉, C₁₀, C₁₄. Berikut adalah gambar struktur senyawa 2-hidroksi benzil galat galat (gambar 4.4) dan hasil analisis ¹H NMR dan ¹³C NMR dapat dilihat pada tabel 4.5.



Gambar 4.4 Struktur 2-Hidroksi Benzil Galat

Tabel 4.5 Hasil Analisis Spektrum ¹H NMR dan ¹³C NMR Senyawa 2-Hidroksi Benzil Galat (Lampiran 3)

Posisi	δC (ppm)	δH (ppm)	Multiplisitas	Jumlah atom H
1	130,2			
2	138,8			
3	121,7	6,8	Doublet (J: 8 Hz)	1
4	120,3	7,2	Multiplet	1
5	123,7	6,9	Doublet (J: 8,6 Hz)	1
6	116,2	7,37	Multiplet	1
7	62,4	5,3	Singlet	2
8	166,9			

9	130,7			
10	109,8	7,1	Singlet	1
11	146,1			
12	156,3			
13	146,1			
14	109,8	7,1	Singlet	1

4.2.4. Sintesis Senyawa 4-metoksi-2-hidroksi Benzil Galat

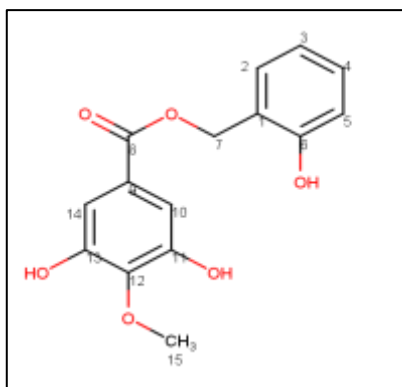
Hasil analisis awal senyawa sintesis menggunakan KLT menunjukkan pemisahan yang baik dengan harga Rf sekitar 0,7 dengan komposisi eluen antara CHCl_3 : MeOH (5:1). Pemurnian senyawa menggunakan kromatografi kolom dengan tingkat kemurnian >60%. Hal ini didasarkan pada karakterisasi spektrum ^1H NMR dan ^{13}C NMR. Yield yang dihasilkan untuk senyawa 2-hidroksi benzil galat sebesar 51,05%.

Spektrum FT-IR senyawa ini menunjukkan adanya serapan pada 1703 cm^{-1} untuk gugus karbonil C=O yang diperkuat oleh serapan 1002 cm^{-1} untuk gugus C-O ester. Daerah serapan melebar pada daerah 3300 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus OH dan diperkuat dengan ikatan -C-OH pada gugus aromatisnya pada pita serapan 1220 cm^{-1} serta daerah serapan 1430 cm^{-1} untuk ikatan rangkap C=C aromatis.

Analisis MS menunjukkan massa molekul relatif senyawa dengan rumus $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$ tidak mencapai target sesuai teoritis dan perhitungan software MarvinSketch sebesar 290,0790. Tetapi beberapa fragmentasi yang dihasilkan senyawa yaitu 272 dan 198 menunjukkan senyawa sudah terbentuk. Adanya gugus hidroksil pada atom C_6 tidak muncul, akibat putusanya ikatan senyawa pada proses analisis. Hal ini disebabkan karena energi yang ditembakkan ketika proses ionisasi terlalu besar, sehingga *peak* dan massa senyawa tidak terfragmentasi pada spektrum massa (Silverstein et al, 2005). Kemungkinan lainnya adalah partikel sampel berumur lebih pendek ketika proses pengionan sehingga senyawa tidak dapat terdeteksi secara keseluruhan dan hanya produk fragmentasi-fragmentasinya yang menunjukkan *peak* (Supratman, 2010) (lampiran 4).

Spektrum ^1H NMR senyawa ini memberikan sinyal pada pergeseran kimia 6,8 ppm (1H, m, -CH), 6,9 ppm (1H, m, -CH) dan 6,7 ppm (1H, m, -CH) yang mewakili 4 proton pada posisi atom C_2 , C_3 , C_5 dan C_4 . Pada daerah kimia 7,1 ppm (1H, s, -CH) mewakili posisi C_{10} dan C_{14} . Sedangkan pergeseran kimia 3,9 ppm (2H, s, $-\text{CH}_2$) menunjukkan posisi C_7 . Puncak pergeseran 3,8 ppm (3H, s, $-\text{OCH}_3$) merupakan suatu proton metoksi yang terikat pada gugus C-O dengan daerah lebih downfield karena proton bersifat tidak terlindungi.

Pergeseran kimia pada spektrum ^{13}C NMR terletak pada daerah 167 ppm untuk gugus ester ($\text{C}=\text{O}$) dengan posisi C_8 . Pada daerah kimia 117 ppm, 127,8 ppm, 115,5 ppm, 120,3 ppm, 127,6 ppm, dan 137,4 ppm menunjukkan atom karbon pada posisi C_1 - C_6 . Pada daerah kimia 137,4 ppm ditunjukkan bahwa posisi C_6 berikatan dengan gugus hidroksi ($-\text{OH}$). Sedangkan daerah pergeseran 130,5 ppm, 109,7 ppm, 151,3 ppm, 150,1 ppm dan 109,7 ppm menunjukkan untuk atom karbon posisi C_9 - C_{14} . Untuk pergeseran kimia 60,9 ppm, 167,1 ppm dan 26,9 ppm untuk atom karbon C_7 , C_8 , dan C_{15} berturut-turut. Berikut adalah gambar struktur senyawa benzil galat (gambar 4.5) dan hasil analisis ^1H NMR dan ^{13}C NMR dapat dilihat pada tabel 4.6.



Gambar 4.5 Struktur 4-Metoksi-2-Hidroksi Benzil Galat

Tabel 4.6 Hasil Analisis Spektrum ^1H NMR dan ^{13}C NMR Senyawa 4-Metoksi-2-Hidroksi Benzil Galat (Lampiran 4)

Posisi	δC (ppm)	δH (ppm)	Multiplisitas	Jumlah atom H
1	117			
2	127,8	6,8	Multiplet	1

3	115,5	6,9	Multiplet	1
4	120,3	6,7	Multiplet	1
5	127,6	6,9	Multiplet	1
6	137,4			
7	60,9	3,9	Singlet	2
8	167,1			
9	130,5			
10	109,7	7,1	Singlet	1
11	151,3			
12	150,1			
13	151,3			
14	109,7	7,1	Singlet	1
15	26,9	3,8	Singlet	3

4.2.5. Sintesis Senyawa Feniletil Galat

Hasil analisis awal senyawa sintesis menggunakan KLT menunjukkan pemisahan yang baik dengan harga Rf sekitar 0,67 dengan komposisi eluen antara CHCl_3 : MeOH (5:1). Pemurnian senyawa menggunakan kromatografi kolom dengan tingkat kemurnian >80%. Hal ini didasarkan pada karakterisasi spektrum ^1H NMR dan ^{13}C NMR. Yield yang dihasilkan untuk senyawa feniletil galat sebesar 58,87%.

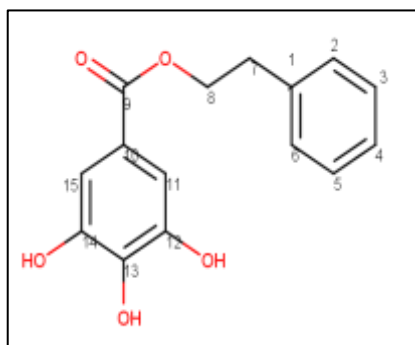
Spektrum FT-IR untuk senyawa derivat feniletil galat menunjukkan adanya serapan 1705 cm^{-1} untuk gugus karbonil (C=O) dan didukung oleh vibrasi ulur dengan serapan 1020 cm^{-1} untuk C-O gugus ester. Pita serapan melebar pada daerah 3350 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus -OH. Sedangkan daerah serapan 1450 cm^{-1} merupakan vibrasi ulur untuk ikatan rangkap C=C aromatis yang didukung oleh pita serapan 1215 cm^{-1} sebagai ikatan C-OH pada senyawa aromatis.

Analisis MS menunjukkan bahwa senyawa dengan rumus molekul $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_5$ mempunyai massa molekul relatif sebesar m/z 274,0841 (lampiran 5). Hal ini sesuai dengan perhitungan teoritis dan software MarvinSketch untuk

massa relatif senyawa feniletil galat adalah sebesar 274,0841.

Spektrum ^1H NMR feniletil galat memberikan pergeseran kimia 7,3 ppm (4H, m, -CH) untuk senyawa aromatis yang mewakili 4 proton pada posisi C_2 , C_3 , C_4 dan C_5 . Pergeseran kimia 6,6 ppm (1H, s, -CH) untuk posisi atom C_4 . Sedangkan pergeseran kimia untuk senyawa aromatis lainnya pada daerah 7,2 ppm (1H, s, -CH) mewakili posisi C_{11} dan C_{15} . Pada daerah kimia 2,9 ppm dan 4,4 ppm (2H, d, $-\text{CH}_2$) masing-masing mewakili posisi C_7 dan C_8 .

Pergeseran kimia untuk spektrum ^{13}C NMR senyawa feniletil galat menunjukkan daerah 166,6 ppm untuk gugus ester ($\text{C}=\text{O}$) pada posisi C_9 . Daerah kimia 129,8 ppm dan 129,2 ppm masing-masing mewakili dua atom karbon pada senyawa aromatis untuk posisi C_2 , dan C_6 ; C_3 dan C_5 . Senyawa aromatis lainnya menunjukkan pergeseran kimia 107,8 ppm dan 139,3 yang masing-masing mewakili dua atom karbon pada posisi C_{11} dan C_{15} ; C_{12} dan C_{14} (berikatan dengan gugus OH). Daerah kimia 127 ppm dan 146,5 ppm mewakili posisi atom C_4 dan C_{13} (terikat gugus OH) pada masing-masing senyawa aromatis. Pergeseran kimia lainnya yaitu 35,8 ppm dan 65,5 ppm untuk posisi C_7 dan C_8 . Berikut adalah gambar struktur senyawa benzil galat (gambar 4.6) dan hasil analisis ^1H NMR dan ^{13}C NMR dapat dilihat pada tabel 4.7.



Gambar 4.6 Struktur Feniletil Galat

Tabel 4.7 Hasil Analisis Spektrum ^1H NMR dan ^{13}C NMR Senyawa Feniletil Galat (Lampiran 5)

Posisi	δC (ppm)	δH (ppm)	Multiplisitas	Jumlah atom H
1	128,6			
2	129,8	7,3	Multiplet	1

3	129,2	7,3	Multiplet	1
4	127	6,6	Singlet	1
5	129,2	7,3	Multiplet	1
6	129,8	7,3	Multiplet	1
7	35,8	2,9	Quartet	2
8	65,5	4,4	Quartet	2
9	166,6			
10	146,3			
11	107,8	7,2	Singlet	1
12	139,3			
13	146,5			
14	139,3			
15	107,8	7,2	Singlet	1

4.3. Hasil Uji Sitotoksitas Dengan Metode MTT

Hasil uji sitotoksitas senyawa asam galat, derivatnya dan obat antikanker terhadap sel kanker kolon HCT-116 dapat dilihat pada gambar 4.7.



Gambar 4.7 Grafik IC_{50} Asam Galat, Derivatnya dan Cetuximab Pada Sel HCT-116

Gambar 4.7, menunjukkan bahwa empat senyawa derivat asam galat yaitu benzil galat (24,79 $\mu\text{g/mL}$), 2-hidroksi benzil galat (21,82 $\mu\text{g/mL}$), 4-metoksi-2-hidroksi benzil galat (26,98 $\mu\text{g/mL}$) dan feniletil galat (19,93 $\mu\text{g/mL}$) memiliki aktivitas antikanker yang cukup baik dengan menghambat pertumbuhan sel kanker kolon, jika dibandingkan senyawa penuntun asam galat dan kontrol positif cetuximab.

Gugus hidroksi (OH) dan alkil pada empat senyawa derivat tersebut diperkirakan memiliki peranan penting dalam aktivitas. Gugus hidroksi pada senyawa diduga mempunyai interaksi pengikatan senyawa pada sisi pengikatan (*binding site*) sel target melalui ikatan hidrogen yang terlibat antara dua molekul yang bekerja sebagai donor dan akseptor. Donor ikatan hidrogen adalah proton dari fenol yang menempel pada atom oksigen yang bersifat elektronegatif dan sebagai akseptornya adalah gugus-gugus OH yang ada pada sel target (Patrick, 2001). Selain itu, gugus hidroksi juga dapat meningkatkan efek sitotoksik dari sebuah senyawa.

Hasil uji MTT-assay menunjukkan bahwa asam galat (1) menunjukkan penghambatan terhadap pertumbuhan sel kanker kolon dengan nilai IC_{50} sebesar 34,91 $\mu\text{g/mL}$. Penelitian Devi *et al*, (2014) juga melaporkan bahwa asam galat mampu menghambat pertumbuhan sel kanker kolon. Senyawa etil galat (2) dengan penambahan gugus etil dan monometoksi asam galat (9) dengan perubahan gugus hidroksi menjadi metoksi menunjukkan penurunan dalam menghambat sel kanker kolon dengan IC_{50} masing-masing yaitu 35,96 $\mu\text{g/mL}$ dan 37,75 $\mu\text{g/mL}$. Kemungkinan berkurangnya gugus hidroksi pada asam galat menjadi penyebab berkurangnya aktivitas penghambatan terhadap sel kanker kolon karena gugus hidroksi merupakan komponen antioksidan yang penting. Penelitian yang dilakukan oleh Locateli *et al*, (2008) menunjukkan bahwa gugus hidroksi pada senyawa asam galat berperan penting dalam aktivitas biologisnya.

Senyawa (2-hidroksi) benzil galat (13) memberikan aktivitas lebih baik dalam menghambat pertumbuhan sel kanker kolon daripada senyawa benzil galat (12) dengan nilai IC_{50} masing-masing adalah 21,82 $\mu\text{g/mL}$ dan 24,79 $\mu\text{g/mL}$. Kemungkinan hal ini disebabkan penambahan gugus hidroksi pada senyawa

benzil galat berkontribusi dalam meningkatkan aktivitas antikanker. Gugus hidroksi juga mempunyai kemampuan meningkatkan aktivitas dalam menghambat pertumbuhan sel kanker (Hanafi & Thelma, 1998).

Senyawa feniletil galat (20) menunjukkan aktivitas paling baik dalam menghambat proliferasi sel kanker kolon dengan IC_{50} lebih rendah dibandingkan dengan etil galat (2) yaitu 19,93 $\mu\text{g/mL}$ dan 35,96 $\mu\text{g/mL}$. Penambahan gugus alkil seperti benzil pada etil galat dapat meningkatkan hidrofobisitas. Peningkatan hidrofobisitas ini diperkirakan menyebabkan peningkatan afinitas terhadap membran sel dan permeabilitasnya ke dalam sel (Locateli *et al*, 2013). Peningkatan aktivitas penghambatan ini dapat dijelaskan dari peningkatan lipofilisitas akibat jumlah alkil yang bertambah sehingga memudahkan senyawa ini untuk menembus membran sel. Penambahan gugus cabang pada derivat asam galat juga akan mengubah sifat dan kelarutan senyawa. Senyawa lebih bersifat lipofilik akibat adanya penurunan polaritas dan akan lebih mudah untuk menembus lipid bilayer sehingga meningkatkan efektivitasnya sebagai antikanker (Mannhold, 2008).

Selanjutnya senyawa (2-hidroksi) benzil galat (13) memberikan nilai IC_{50} yang lebih baik daripada senyawa 4-metoksi (2-hidroksi) benzil galat yaitu sebesar 21,82 $\mu\text{g/mL}$ dan 26,98 $\mu\text{g/mL}$. Kemungkinan dikarenakan jumlah gugus hidroksil senyawa berkurang, akibat penggantian oleh gugus metoksi. Karena kemampuan antioksidan suatu senyawa bergantung pada jumlah dan letak gugus hidroksi (OH) pada molekul (Kaur *et al*, 2011). Sedangkan untuk senyawa antikanker cetuximab menunjukkan penghambatan terhadap sel kanker kolon dengan IC_{50} sebesar 33,53 $\mu\text{g/mL}$. Penelitian Son *et al*, (2015) dan Moreli *et al*, (2005) melaporkan nilai yang berbeda untuk nilai IC_{50} cetuximab masing-masing yaitu sebesar 358 $\mu\text{g/mL}$ pada sel *line* HCT-116 dan 2,5 $\mu\text{g/mL}$ pada sel kanker epitelial dengan target EGFR. Perbedaan tersebut, kemungkinan disebabkan karena jenis sel *line* yang berbeda. Penelitian Park *et al*, (2016), melaporkan juga bahwa cetuximab menghambat proliferasi dan menginduksi apoptosis sel kanker kolon sebesar 28,1% melalui signal EGFR dan mengurangi ekspresi COX-2.

Hasil simulasi docking berbanding lurus dengan uji MTT-assay. Empat

senyawa derivat asam galat dengan *binding energy* terendah yaitu senyawa benzil galat (12), (2-hidroksi) benzil galat (13), 4-metoksi-(2-hidroksi) benzil galat (17) dan feniletil galat (20) menunjukkan aktivitas yang sangat baik dengan menghambat proliferasi sel kanker kolon dengan nilai IC_{50} masing-masing adalah 24,79 $\mu\text{g/mL}$, 21,82 $\mu\text{g/mL}$, 26,98 $\mu\text{g/mL}$ dan 19,93 $\mu\text{g/mL}$.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Hasil penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Hasil simulasi docking menunjukkan bahwa empat senyawa derivat asam galat yang memberikan nilai *binding energy* terkecil adalah benzil galat (12), 2-hidroksi benzil galat (13), 4-metoksi-2-hidroksi benzil galat (17) dan feniletal galat (20) dengan nilai masing-masing adalah -7,36, -7,63, -7,18 dan -7,47.
2. Sintesis senyawa derivat asam galat berupa benzil galat (12), 2-hidroksi benzil galat (13), 4-metoksi-2-hidroksi benzil galat (17) dan feniletal galat (20) dapat disintesis dan menghasilkan rendemen masing-masing yaitu 62,11%, 53,25%, 51,05% dan 58,87%.
3. Uji sitotoksitas menunjukkan bahwa senyawa yang memiliki aktivitas terbaik dalam menghambat pertumbuhan sel kanker kolon pada sel HCT-116 adalah senyawa feniletal galat (20) dengan IC_{50} sebesar 19,93 $\mu\text{g/mL}$.

5.2. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menguji aktivitas sitotoksik senyawa derivat asam galat pada kanker kolon secara *in vivo*.

DAFTAR ACUAN

- Agarwal, C., Tyagi, A., & Agarwal, R. (2006). Gallic Acid Causes Inactivating Phosphorylation of cdc25A/cdc25C-cdc2 via ATM-Chk2 Activation, Leading to Cell Cycle Arrest, and Induces Apoptosis in Human Prostate Carcinoma DU145 Cells. *Mol Cancer Ther.* 5(12), 3294-3302.
- Agui, T., McConkey, D. J., & Tanigawa, N. (2002). Comparative Study of Various Biological Parameters, Including Expression of Survivin, Between Primary and Metastatic Human Colonic Adenocarcinomas. *Anticancer Res.* 22(3), 1769-1776.
- Balakrishnan, a. (2006). Apical Sodium Dependent Bile Acid Transporter : A Potential Prodrug Target. *Mol Pharm,* 3(3), 223–230.
- Barrett, J. C. (1993). Mechanisms of Multistep Carcinogenesis and Carcinogen Risk Assessment. *Environ Health Perspect.* 100(12), 9–20.
- Cancer Chemoprevention Research Center. (2013). Prosedur Uji Sitotoksitas Metode MTT. Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada.
- Chan, T. L., Zhao, W., Leung, S. Y., & Yuen, S. T. (2003). BRAF and KRAS Mutations in Colorectal Hyperplastic Polyps and Serrated Adenomas. *Cancer Res,* 63(16), 4878–4881.
- Chávez, J. H., Leal, P. C., Yunes, R. A., Nunes, R. J., Barardi, C. R., Pinto, A. R., ... & Zanetti, C. R. (2006). Evaluation of Antiviral Activity of Phenolic Compounds and Derivatives Against Rabies Virus. *Vet Microbiol.* 116(1), 53-59.
- Cheng Chang, Sean Ekins, Praveen Bahadduri, and P. W. S. (2006). Pharmacophore-Based Discovery of Ligands for Drug Transporters. *Adv Drug Deliv Rev,* 42(2), 157–162.
- Chu, Y. F., Sun, J. I. E., Wu, X., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Vegetables. *J Agric Food Chem.* 50(23), 6910-6916.
- Desen, W., (2008). Onkologi Klinis. Penerjemah : Willie Japaries. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Devi, Y. P., Uma, A., Narasu, M. L., Kalyani, C. (2014). Anticancer Activity of

- Gallic Acid on Cancer Cell Lines HCT-15 and MDA-MB 231. *Int J Res Appl Nat Soc Sci.* 2(5), 269-272.
- Direktorat Jenderal Pelayanan Medik Departemen Kesehatan RI. (2005). Indikator Kerja Rumah Sakit. Jakarta: Bharata Karya Aksara
- Dodo, K., Minato, T., Noguchi-Yachide, T., Suganuma, M., & Hashimoto, Y. (2008). Antiproliferative and Apoptosis-inducing Activities of Alkyl Gallate and Gallamide Derivatives Related to (-)-Epigallocatechin Gallate. *Bioorg Med Chem.* 16(17), 7975–82.
- Faried, A., Kurnia, D., Faried, L. S., Usman, N., Miyazaki, T., Kato, H., & Kuwano, H. (2007). Anticancer Effects of Gallic Acid Isolated from Indonesian Herbal Medicine, *Phaleria Macrocarpa* (Scheff.) Boerl, on human cancer cell lines. *Int J Oncol.* 30(3), 605–613.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., et al. (2015). Cancer Incidence and Mortality Worldwide: Sources, Methods and Major Patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 136(5). 1-76.
- Field, L.D., Sternhell, S., Kalman, J. R. (1998). *Organic Structures From Spectra* Third Edition. John Wiley & Sons, LTD.
- Fiuza, S. M., Gomes, C., Teixeira, L. J., Girão da Cruz, M. T., Cordeiro, M. N. D. S., Milhazes, *et al.* (2004). Phenolic Acid Derivatives with Potential Anticancer Properties a Structure-Activity Relationship Study. Part 1: Methyl, Propyl and Octyl Esters of Caffeic and Gallic Acids. *Bioorg Med Chem.* 12, 3581–3589.
- Fong, P., & Lei, H. (2010). A Systematic Review on Computer-Aided Drug Design : Docking and Scoring. *J Mac Polytech Inst.*, 47-51.
- Forester, S. C., Choy, Y. Y., Waterhouse, A. L., & Oteiza, P. I. (2014). The Anthocyanin Metabolites Gallic Acid , Decrease Human Colon Cancer Cell Viability by Regulating Pro-Oncogenic Signals. *Mol Carcinog.* 53, 432–439.
- Forester, S. C., & Waterhouse, A. L. (2010). Gut Metabolites of Anthocyanins , Gallic Acid , 3-O -Methylgallic Proliferation of Caco-2 Cells. *J Agric Food*

- Chem.* 58, 5320–5327.
- Gryfe, R., Swallow, C., Bapat, B., Redston, M., Gallinger, S., & Couture, J. (1997). Molecular Biology of Colorectal Cancer. *Curr Probl Cancer*, 21(5), 1–66.
- Hanafi, M., & Thelma, A. B. 1998. Sintesis Senyawa Analog Antibiotika UK-3, Pengaruh Gugus Hidroksi Terhadap Aktivitas Biologi. Prosiding Seminar Nasional II Kimia dalam Pembanguna Holiday Inn. Yogyakarta.
- Harbone, J.B. (1987). Metode Fitokimia. (Ed II). (Diterjemahkan Oleh Kosasih Patmawinata dan Iwang Sudiro,). Bandung : ITB
- Harmita, et al. (2006). Analisis Kuantitatif Bahan Baku dan Sediaan Farmasi. Depok: Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.
- Harris, P. A., & Signaling, B. K. (2014). *Targeting B-RAF*: The Discovery and Development of B-RAF Inhibitors. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-396521-9.00018-8>
- Hengartner, M. O. (2000). The Biochemistry of Apoptosis. *Nature*, 407, 810–816.
- Hodgson, J. M., Morton, L. W., Puddey, I. B., Beilin, L. J., & Croft, K. D. (2000). Gallic Acid Metabolites are Markers of Black Tea Intake in Humans. *J Agric Food Chem.* 48(6), 2276–80.
- Hwang, J., Ha, J., Park, I., Lee, S., Woon, H., Min, Y., & Jin, O. (2007). Apoptotic effect of EGCG in HT-29 colon cancer cells via AMPK signal pathway. *Cancer Lett.* 247, 115–121.
- Inoue M., R. Suzuki, T. Koide, N. Saguchi, Y. Ogihara, & Y. Y. (1994). Antioxidant, Gallic Acid, Induces Apoptosis In HL-60RG Cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 204(2), 898–904.
- Inoue, M., Sakaguchi, N., Isuzugawa, K., TANI, H., & OGIHARA, Y. (2000). Role of reactive oxygen species in gallic acid-induced apoptosis. *Biol Pharm Bull.* 23(10), 1153-1157.
- Jara, J. A., Castillo, V.S., Olavaria, J. S., Peredo, L., Pavanni, M., Jara, F. (2014). Antiproliferative and Uncoupling Effects of Delocalized, Lipophilic, Cationic Gallic Acid Derivatives on Cancer Cell Lines. Validation in Vivo

- in Singenic Mice. *J Med Chem*, 57, 2440-2454.
- Jemal, A., Bray, F., & Ferlay, J. (2011). Global Cancer Statistics. *Cancer J Clin.* 61(2), 69–90. doi:10.3322/caac.20107.
- Johansson, C. H., & Brage, S. E. (2014). Pharmacology & Therapeutics BRAF Inhibitors in Cancer Therapy. *Pharmacol Therapeutics*. 142(2), 176–182.
- Junaedi, Sendy, Endah P. Septi, dkk. 2008. Uji Sitotoksitas Metode MTT. *Cancer Chemoprevention Research Center*. Fak. Farmasi UGM.
- Kam, A., Li, K. M., Razmovski-Naumovski, V., Nammi, S., Shi, J., Chan, K., & Li, G. Q. (2013). A Comparative Study on the Inhibitory Effects of Different Parts and Chemical Constituents of Pomegranate on α -Amylase and α -Glucosidase. *Phytother Res*. 27(11), 1614-1620.
- Kang, M. S., Oh, J. S., Kang, I. C., Hong, S. J., & Choi, C. H. (2008). Inhibitory Effect of Methyl Gallate And Gallic Acid on Oral Bacteria. *J Microbiol*. 46(6), 744-750.
- Kastomo, D. R. (2007). Kolon Endometriosis. *Indonesian Journal of Cancer*. 2, 73–76.
- Kaur, M., Velmurugan, B., Rajamanickam, S., Agarwal, R., & Agarwal, C. (2009). Gallic Acid, an Active Constituent of Grape Seed Extract, Exhibits Anti-Proliferative, Pro-apoptotic and Anti-tumorigenic Effects Against Prostate Carcinoma Xenograft Growth in Nude Mice. *Pharm Res*. 26(9), 2133-2140.
- Kaur R, Singh B, Arora S. (2011). Amelioration of oxidative damage by Methyl Gallate in Different in vitro Models. *Phytopharmacology*. 1(4) 82-94
- Kawada, M., Ohno, Y., Ri, Y., Ikoma, T., Yuugetu, H., Asai, T., Watanabe, M., Yasuda, N., Akao, S., Takemura, G., Minatoguchi, S., Gotoh, K., Fujiwara, H., Fukuda, K., (2001). Anti-tumor effect of gallic acid on LL-2 lung cancer cells transplanted in mice. *Anticancer Drugs*. 12 (10), 847-852.
- Kim, S. H., Jun, C. D., Suk, K., Choi, B. J., Lim, H., Park, *et al.* (2006). Gallic Acid Inhibits Histamine Release and Pro-inflammatory Cytokine Production in Mast Cells. *Toxicol Sci*. 91(1), 123-131.
- Kosela, S. (2010). Cara mudah dan Sederhana Penentuan Struktur Molekul

- Berdasarkan Spektra Data (NMR, Mass, IR, UV). Jakarta : Lembaga Penerbit FE UI, 1, 202.
- Kratz, J. M., Andrighetti-Fröhner, C. R., Leal, P. C., Nunes, R. J., Yunes, R. A., Trybala, *et al.* (2008). Evaluation of Anti-HSV-2 Activity of Gallic Acid and Pentyl Gallate. *Biol Pharm Bull.* 31(5), 903-907.
- Larry H. Russell; Elizabeth Mazzio; Ramesh B. Badisa; Zhi-Ping Zhu; Maryamagharahimi; Ebenezer T. Oriaku & Carl B. Goodman. (2012). Autoxidation of Gallic Acid Induces ROS-Dependent Death in Human Prostate Cancer LNCaP Cells. *Anticancer Res.* 32(5), 1595–1602.
- Lill, M. A., & Danielson, M. L. (2011). Computer-Aided Drug Design Platform Using PyMOL. *J Comp Aid Mol Design*, 25(1), 13–19.
- Lee, W. M. (2001). Process Using Hydroxylamine-Gallic Acid Composition. U.S. Patent No. 6,276,372. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Leicht, D. T., Balan, V., Kaplun, A., Singh-gupta, V., Kaplun, L., Dobson, M., & Tzivion, G. (2007). Raf kinases : Function , Regulation and Role in Human Cancer. *Biochim Bophys Acta*, 1773, 1196–1212.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy B.W., Feeney, P. J. 2001. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery And Development Settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 46: 3-26.
- Lo, C., Lai, T. Y., Yang, J. H., Yang, J. S., Ma, Y. S., Weng, *et al.* (2010). Gallic Acid Induces Apoptosis In A375.S2 Human Melanoma Cells Through Caspase-Dependent and-Independent Pathways. *Int J Oncol.* 37(2), 377-385.
- Locatelli, C., Rosso, R., Santos-Silva, M. C., de Souza, C. a, Licínio, M. a, Leal, *et al.* (2008). Ester Derivatives of Gallic Acid With Potential Toxicity Toward L1210 Leukemia Cells. *Bioorg Med Chem.* 16(7), 3791–9.
- Locatelli, C., Leal, P. C., Yunes, R. A., Nunes, R. J., Pasa, T. B. C. (2009). Gallic Acid Ester Derivatives Induce Apoptosis and Cell Adhesion Inhibition in Melanoma Cells: The Relationship Between Free Radical Generation, Glutathione Depletion and Cell Death. *J Chem Bio Interact*, 181, 175-184.
- Locatelli, C., Filippin-Monteiro, F. B., Pasa, T. B. C. (2013). Alkyl esters of gallic

- acid as anticancer agents : A review. *Eur J Med Chem*, 60: 233-9
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Bretscher, *et al.* (2007). *Molecular Cell Biology* (6th ed.). Newyork : W. H. Freeman and Company.
- Luo, C., Xie, P., & Marmorstein, R. (2008). Identification of BRAF Inhibitors Through In Silico Screening. *J Med Chem*, 51, 6121–6127.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and Bioefficacy of Polyphenols in Humans. Review of 97 Bioavailability Studies. *Am J Clin Nutr*. 81(1), 230S-242S.
- Mannhold R, Kubinyi H, Timmerman H, editors. In: Todeschini R, Consonni V. (2008). *Handbook of Molecular Descriptors Methods and Principal in Medicinal Chemistry*. 11th ed. German: Wiley-VCH.
- March, Jerry. (1977). *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, & Structure*, Second Ed. McGraw-Hill. 349 – 353.
- McCubrey, J. A., Bertrand, F. E., Steelman, L. S., Chang, F., Terrian, D. M., & Franklin, R. A. (2007). Critical roles of the Raf/MEK/ERK Pathway in Apoptosis and Drug Resistance. In *Apoptosis, Cell Signaling, and Human Diseases* (Vol. 2, pp. 101–134).
- Mejia, E. G. de, Song, Y. S., Hecka, C. I., & Mares, M. R. (2010). Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, Antioxidant Capacity and in Vitro Inhibition of Colon Cancer Cell Proliferation. *J Funct Foods*, 2, 23–34.
- Molina, A. R., Vargas, T., Molina, S., Sanchez, J., Romero, M., Valinas, M. G. (2015). The Ellagic Acid Derivative 4,4'-Di-O-methylellagic Acid Efficiently Inhibits Colon Cancer Cell Growth Through a Mechanism Involving WNT16. *J Pharmacol Experiment Therapeut*, 355 (2), 433-444.
- Moreli, M.P., Cascone, T., Troiani, T., Vita, F.D., Orditura, M., Laus, G., *etal.* (2005). Sequence-Dependent Antiproliferative Effects of Cytotoxic Drugs and Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors. *J Annals Onco.*, 16 (4) : iv61-iv68)
- National Center for Biotechnology Information. (n.d.). Gallic Acid - compound summary for CID 370. Diunduh 8 Januari 2016 dari

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/370#section=Top>

- Nemoto, S., Nakamura, M., Osawa, Y., Kono, S., Itoh, Y., & Okano, Y. (2009). Sphingosine Kinase Isoforms Regulate Oxaliplatin Sensitivity of Human Colon Cancer Cells through Ceramide Accumulation and Akt Activation. *J Biol Chem.* 284(16), 10422–10432.
- Ng, T. B., He, J. S., Niu, S. M., Zhao, L., Pi, Z. F., Shao, W., & Liu, F. (2004). A Gallic Acid Derivative and Polysaccharides with Antioxidative Activity from Rose (*Rosa rugosa*) Flowers. *J Pharm Pharmacol.* 56, 537–545.
- Niemetz, R., & Gross, G. G. (2005). Enzymology of Gallotannin and Ellagitannin Biosynthesis. *Phytochemistry*, 66(17), 2001-2011.
- Okimoto, N., Futatsugi, N., Fuji, H., Suenaga, Atsushi, Morimoto, G., et al. (2009). High Performance Drug Discovery : Computational Screening by Combining Docking and Molecular Dynamics Simulation. *PLoS Comp Bio.*, V(10), 1-13.
- Panjaitan, H. P. B. (2015). Aktivitas Sitotoksik Senyawa Turunan Asam Galat Pada Sel Kanker Kolon HCT-116. Skripsi. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Park, M. H., Hong, J. E., Hwang, C. J., Mingi, C., Choi, J. S., An, Y. J., et al. (2016). Synergistic Inhibitory Effect of Cetuximab and Tectochrysin on Human Colon Cancer Cell Growth via Inhibition of EGFR Signal. *Arch Pharm Res.*, Springer, 1-9.
- Patrick, G. L. (2001). *An Introduction to Medicinal Chemistry* (2nd ed.). New York: Oxford University Press.
- Perveen, F., Qureshi, R., Ansari, F.L., Kalsoom, S., Ahmed S. (2011). Investigations of drug–DNA interactions using molecular docking, cyclic voltammetry and UV–Vis spectroscopy. *J Mol Struct.*, 1004, 67–73.
- Powell, S. M., Petersen, G. M., Krush, A. J., & Al, E. (1993). Molecular Diagnosis of Familial Adenomatous Polyposis. *N Engl J Med.* 39(27), 1982–1987.
- Purushottamachar, P., Khandelwal, A., Chopra, P., Maheshwari, N., Gediya, L. K., Vasaitis, et al. (2007). First Pharmacophore-Based Identification of

- Androgen Receptor Down-Regulating Agents: Discovery of Potent Anti-Prostate Cancer Agents. *Bioorg Med Chem*. 15(10), 3413–3421.
- Qin, J., Xie, P., Ventocilla, C., Zhou, G., Vultur, A., Chen, Q., & Al, E. (2012). Identification of a Novel Family of BRAF. *J Med Chem*, 55, 5220–5230.
- Radji, M. (2014). Mekanisme Aksi Molekuler Antibiotik dan Kemoterapi. Jakarta. EGC.
- Ramnath, N., & Adjei, A. (2007). Inhibitors of Raf kinase and MEK Signaling. *Update Cancer Ther*, 2, 111–118.
- Reddy, et.al., (2012). Anti-Leukemic Effect of Gallic Acid on Human Leukemia K562 Cells : Downregulation of COX-2, Inhibition of BCR/ABL Kinase and NF-kB Inactivation. *Toxicol. In Vitro* 26, 396 – 405
- Reed, J. C. (2008). Bcl-2 – Family Proteins and Hematologic Malignancies : History and Future Prospects. *Blood*, 111(7), 3322–3330.
- Rominiyi, O., Broman, D. M., Rajaganeshan, R., & Selvasekar, C. R. (2011). Case Report – Open Access International Journal of Surgery Case Reports Colon Cancer Presenting with Polymyositis. *Int J Surg Case Rep*, 2(7), 225–227.
- Saeki, K., You, A., Isemura, M., Abe, I., Seki, T., & Noguchi, H., (2000). Apoptosis-Inducing Activity of Lipid Derivatives of Gallic Acid. *Pharmaceutical Society of Japan*, 23(11), 1391–1394.
- Salucci, M., Stivala, L. A., Maiani, G., Bugianesi, R., & Vannini, V. (2009). Flavonoids Uptake and Their Effect On Cell Cycle of Human Colon Adenocarcinoma Cells (Caco-2). *Br J Cancer*. 86, 1645–1651.
- Shahrazad, S., Aoyagi, K., Winter, A., Koyama, A., & Bitsch, I., (2001). Pharmacokinetics of Gallic Acid and Its Relative Bioavailability from Tea in Healthy Humans 1. *J. Nutr*. 1207–1210.
- Silverstein, R.M., Webster F.X., & Kiemle, D.J. (2005). Spectrometric Identification of Organic Compounds (7th ed.). New York: John Wiley & Sons, 127-229
- Simadibrata, R. (1990). Karsinoma Kolon-Rektum : Ilmu Penyakit Dalam Jilid II. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.

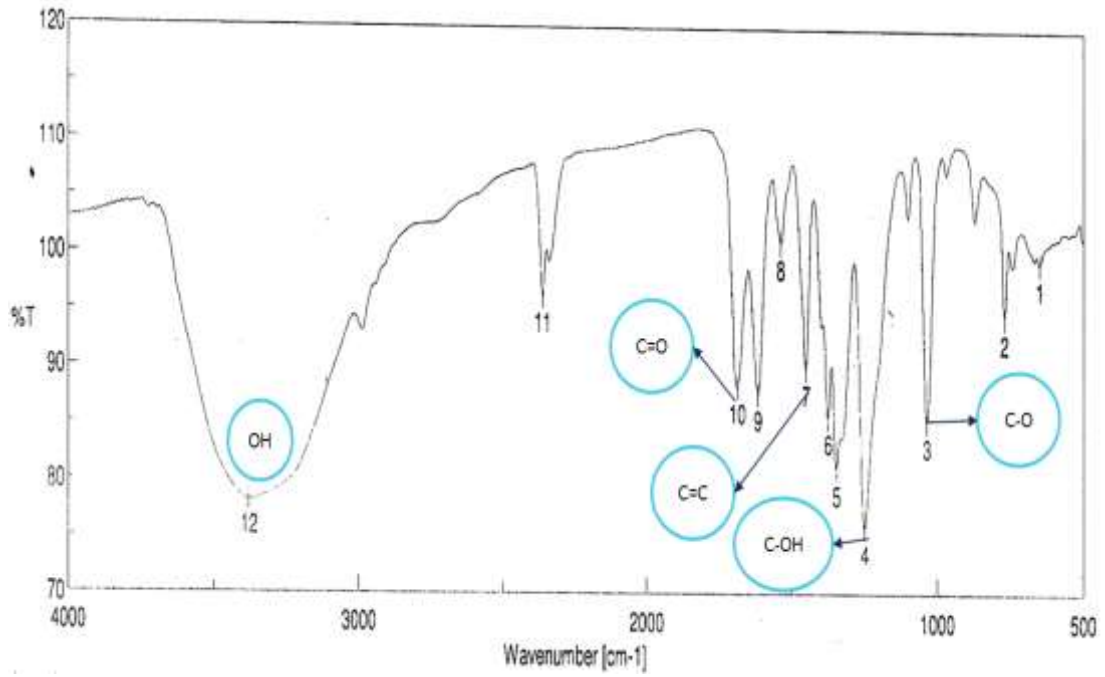
- Sohi, K. K., Mittal, N., Hundal, M. K., & Khanduja, K. L. (2003). Gallic Acid, an Antioxidant, Exhibits Antiapoptotic Potential in Normal Human Lymphocytes: a Bcl-2 Independent Mechanism. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 49(4), 221-227.
- Son, D.J., Hong, J.E., Ban, J.O., Park, J.H., Lee, H.L., Gu, S.M., et al. (2015). Synergistic Inhibitory Effects of Cetuximab and Cisplatin on Human Colon Cancer Cell Growth *via* Inhibition of the ERK-Dependent EGF Receptor Signaling Pathway. *Bio Res Int.*, 1-14.
- Sulikowski, G. A., & Sulikowski, M. M. (n.d.). Iodomethane. In *Original Commentary* (pp. 1–10).
- Supratman, U. (2010). Elusidasi Struktur Senyawa Organik (metode spektroskopi untuk penentuan struktur senyawa organik). Bandung: Widya Padjadjaran.
- Sun, J., Chu, Y. F., Wu, X., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Fruits. *J. Agric. Food Chem.* 50(25), 7449-7454.
- Tambunan, G. W. (1993). Diagnosis Dan Tata Laksana Sepeuluh Jenis Kanker Terbanyak Di Indonesia. EGC. Jakarta.
- Taraphdar A. K., Madhumita, R., & R. K. Bhattacharya., (2001). Natural Product as Inducers of Apoptosis : Implication For Cancer Therapy and Prevention. *Curr. Sci.* 80(11), 1387–1396.
- Tuveson, D. A., Weber, B. L., & Herlyn, M. B. (2003). BRAF as a Potential Therapeutic Target in Melanoma and Other Malignancies. *Cancer Cell*, 4, 95–98.
- Veluri, R., Singh, R. P., Liu, Z., Thompson, J. a., Agarwal, R., & Agarwal, C. (2006). Fractionation of Grape Seed Extract and Identification of Gallic Acid as One of the Major Active Constituents Causing Growth Inhibition and Apoptotic Death of DU145 Human Prostate Carcinoma Cells. *Carcinogenesis*, 27(7), 1445–1453.
- Verma, S., Singh, A., & Mishra, A. (2013). Gallic Acid : Molecular Rival of Cancer. *Environ Toxicol Pharmacol.* 35(3), 473–485.
- Wang, Z. (2010). Steglich Rearrangement. In *Comprehensive Organic Name*

- Reactions and Reagents*, (pp. 2656–2658). John Wiley & Sons, Inc.
- Wolfe, K., Wu, X., & Liu, H. R. (2003). Antioxidant Activity of Apple Peels. *J. Agric. Food Chem.* 51(3), 609–614.
- World Cancer Research Fund. (2011). Update Project Report Summary. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Colorectal Cancer. American Institute for Cancer Research. Continuous.
- Wu, G. (2010). Review : Fucntional Amino Acids in Growth, Reproduction and Health. *J Adv Nutr*, 1, 31-37.
- Yang, Y., Qin, J., Liu, H., & Yao, X. (2011). Molecular Dynamics Simulation, Free Energy Calculation and Structure-Based 3D-QSAR Studies of B-RAF Kinase Inhibitors. *J Chem Inf Model*, 51, 680–692.
- Yanuar, A. (2012). Penambatan Molekul. Praktek dan Aplikasi Pada *Virtual Screening*. Fakultas Farmasi Universitas Indonesia : Depok
- You, B. R., Moon, H. J., Han, Y. H., & Park, W. H. (2010). Gallic Acid Inhibits The Growth of Hela Cervical Cancer Cells Via Apoptosis and/or Necrosis. *Food Chem Toxicol.* 48(5), 1334–1340.
- Zakaria FR. 2001. Pangan dan Pengendalian Kanker. *J. Teknologi dan Industri Pangan* 12(2): 171-177
- Zuo, Y., Chen, H., & Deng, Y. (2002). Simultaneous Determination of Catechins, Caffeine and Gallic Acids in Green, Oolong, Black And Pu-Erh Teas Using HPLC With A Photodiode Array Detector. *Talanta*, 57(2), 307-316.

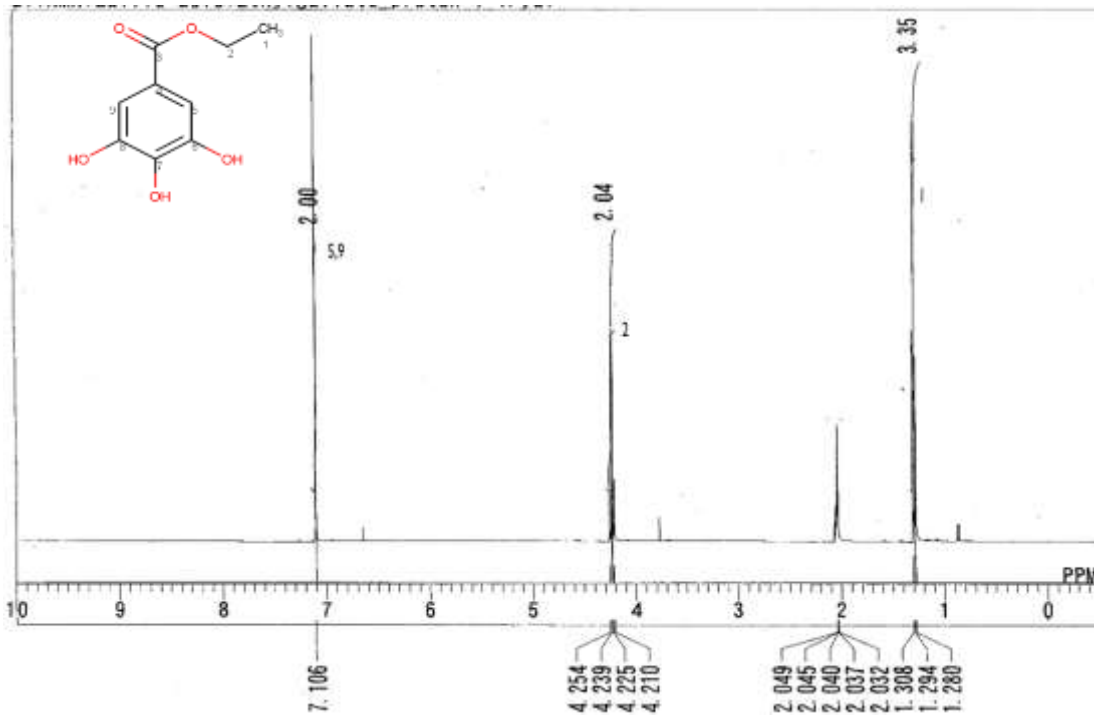
LAMPIRAN-LAMPIRAN

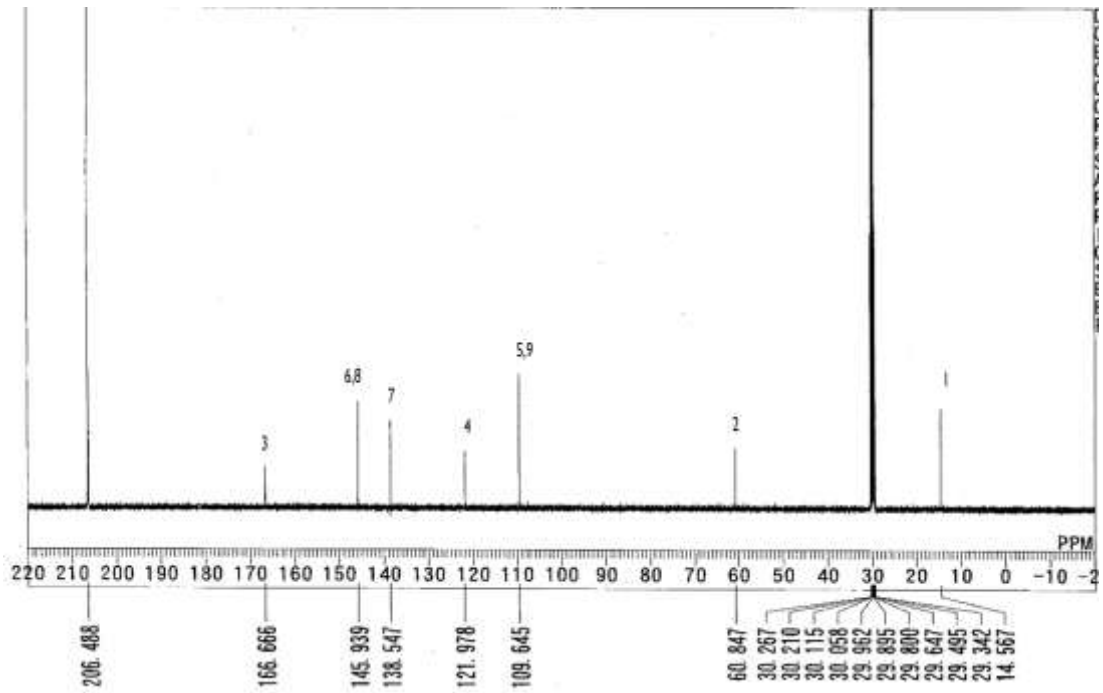
Lampiran 1

Spektrum FT-IR Etil Galat

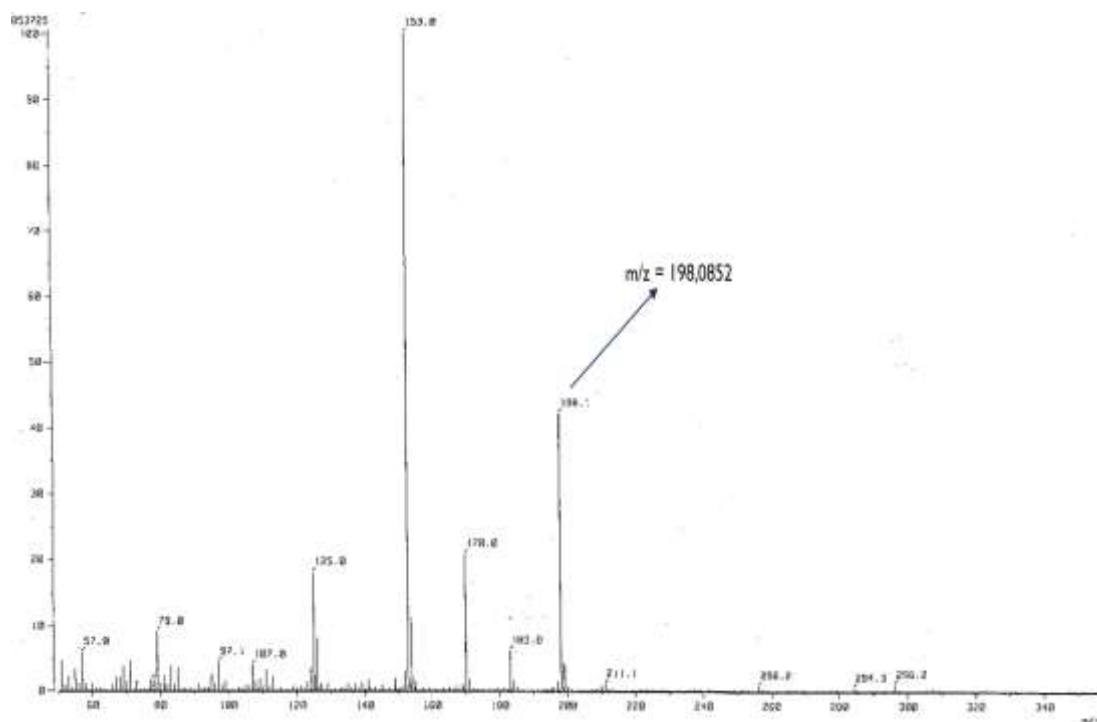


Spektrum ¹H NMR Etil Galat



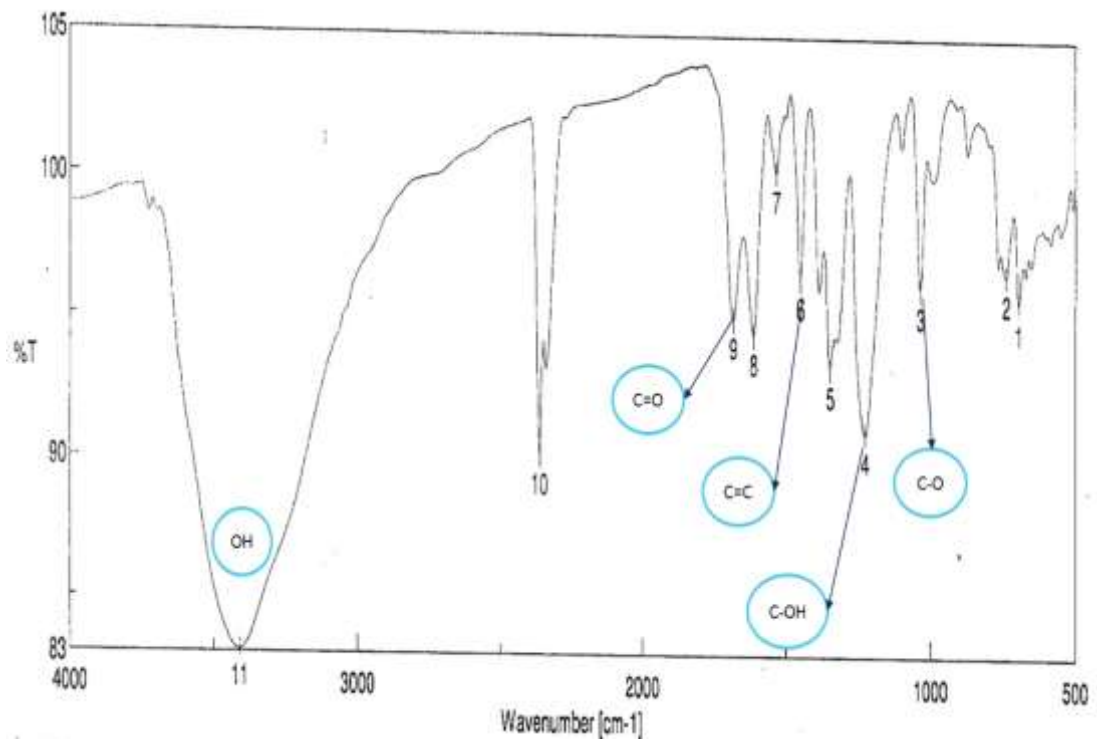
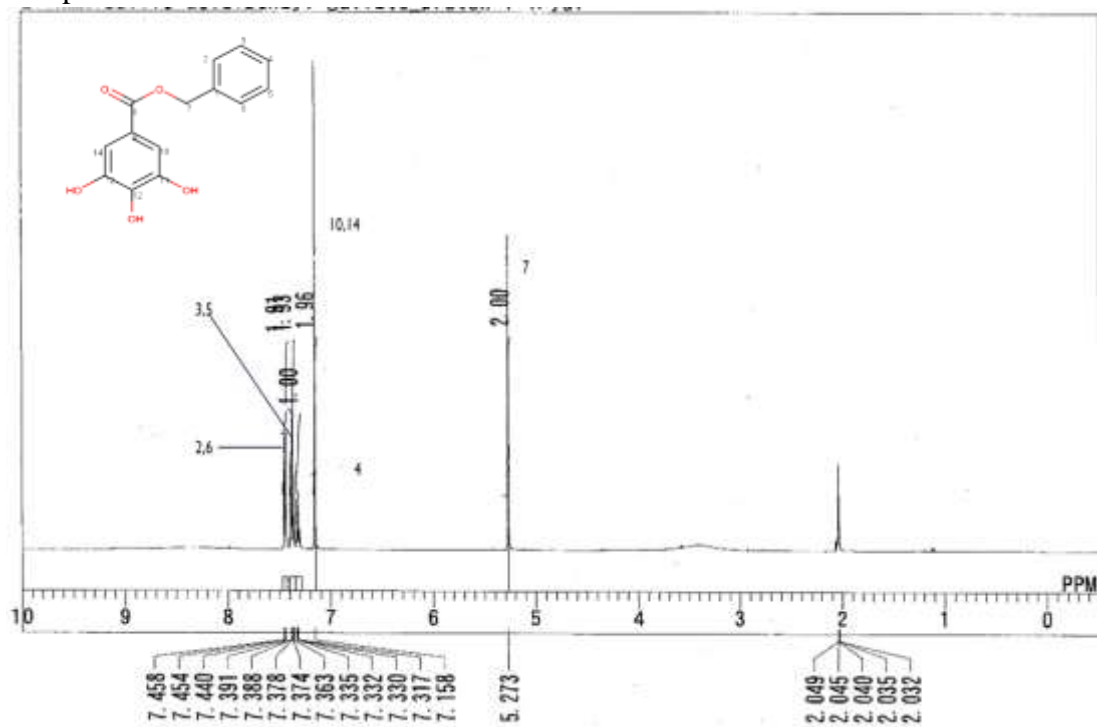
Spektrum ^{13}C NMR Etil Galat

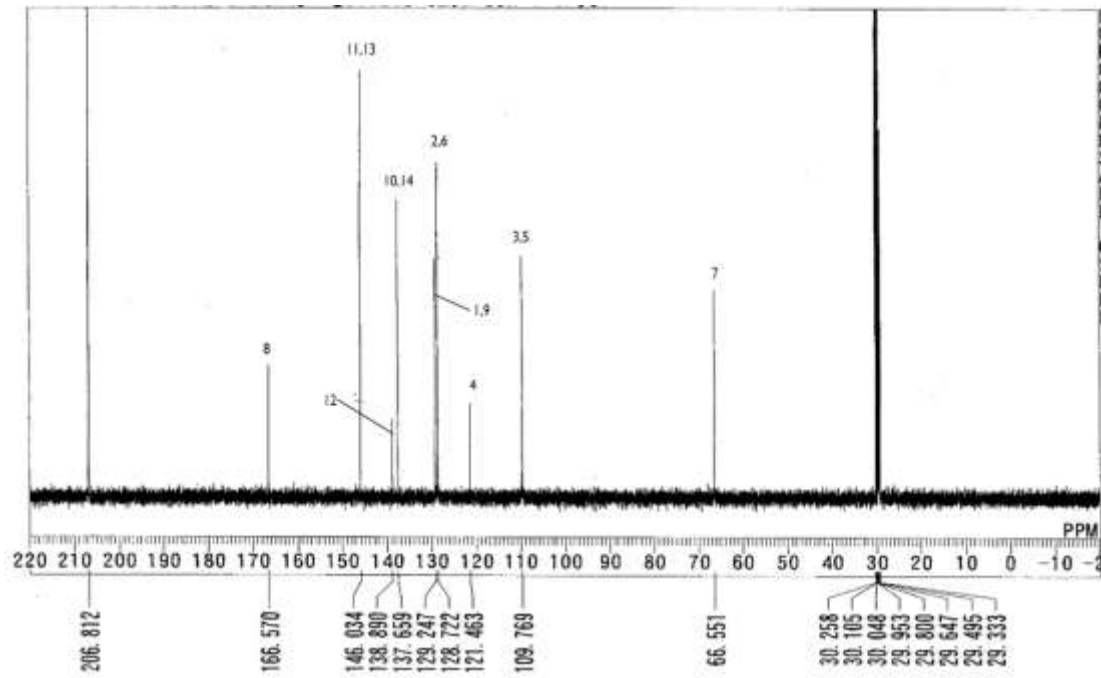
Spektrum Massa Etil Galat



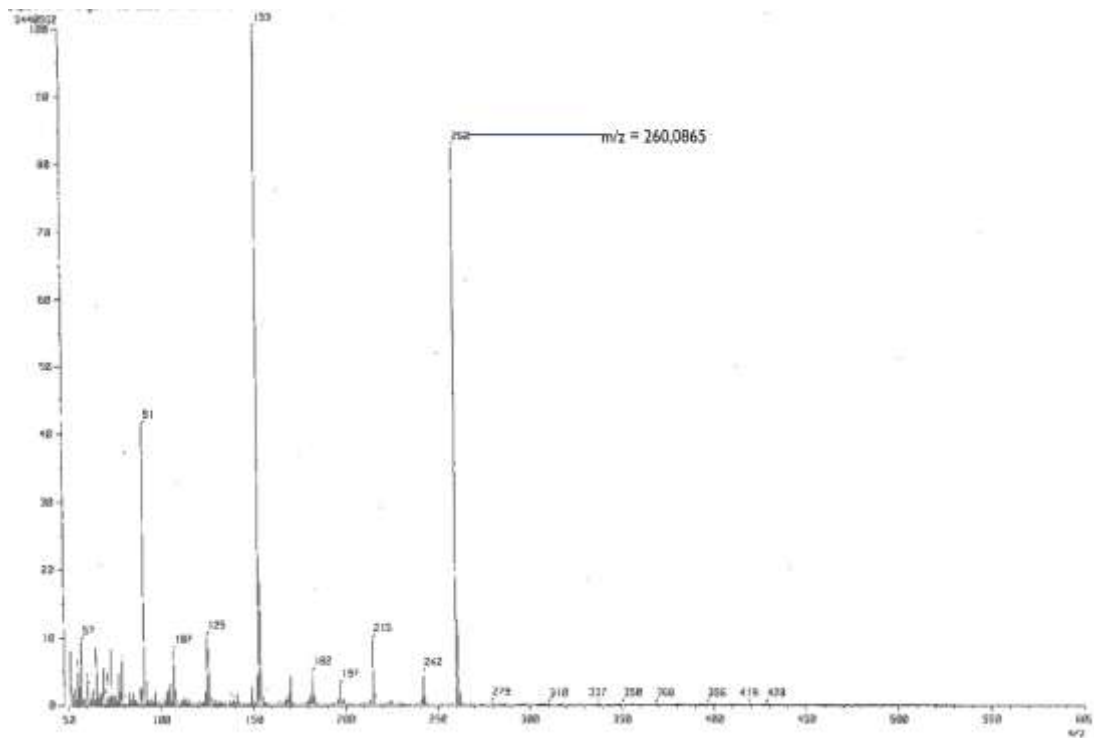
Lampiran 2

Spektrum FT-IR Benzil Galat

Spektrum ¹H NMR Benzil Galat

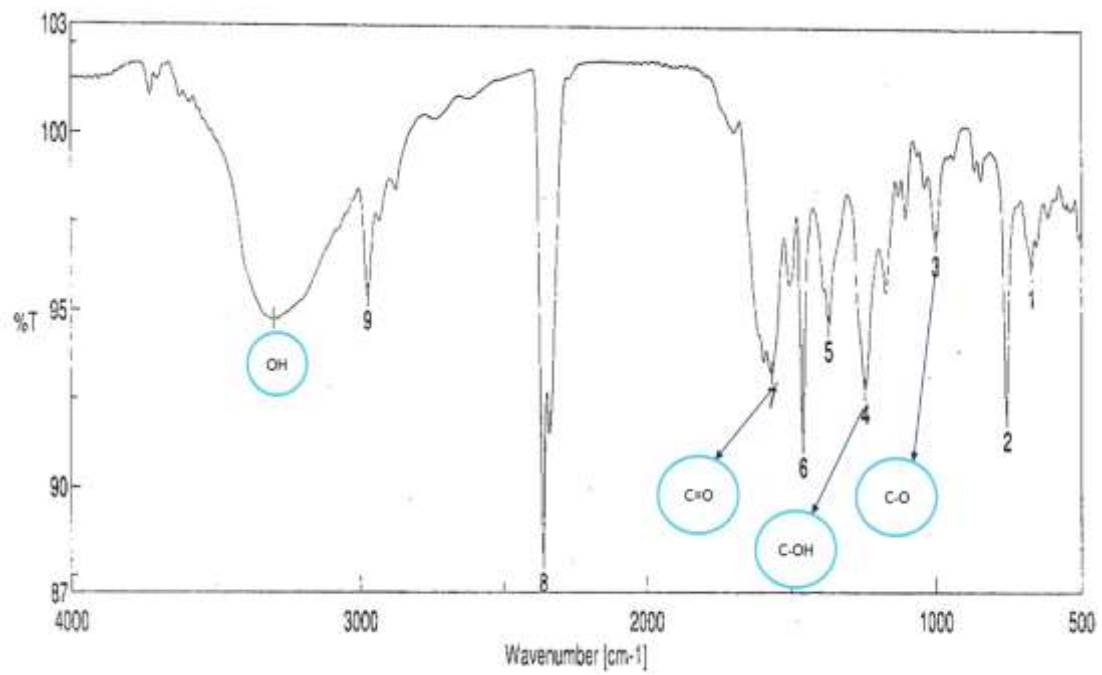
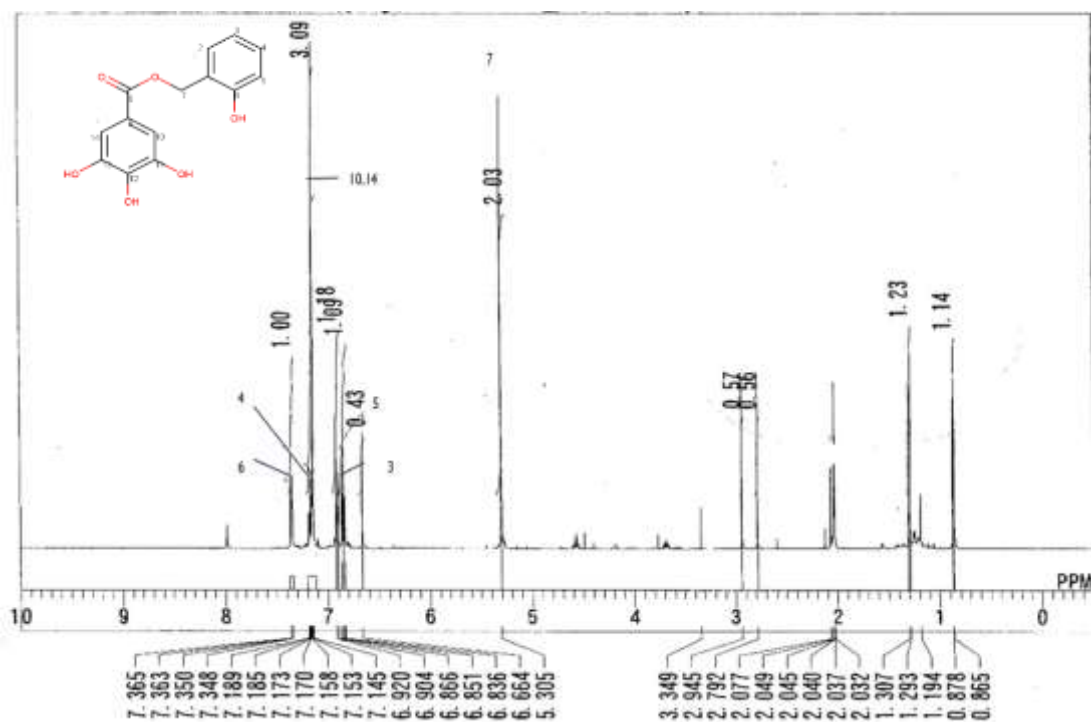
Spektrum ^{13}C NMR Benzil Galat

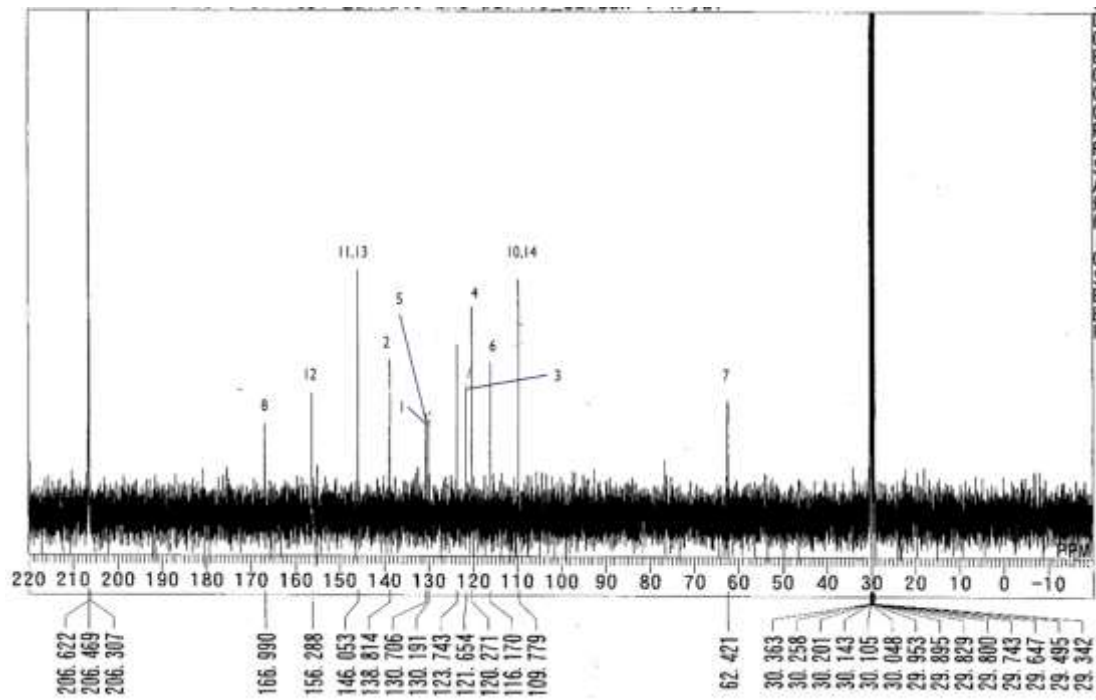
Spektrum Massa Benzil Galat



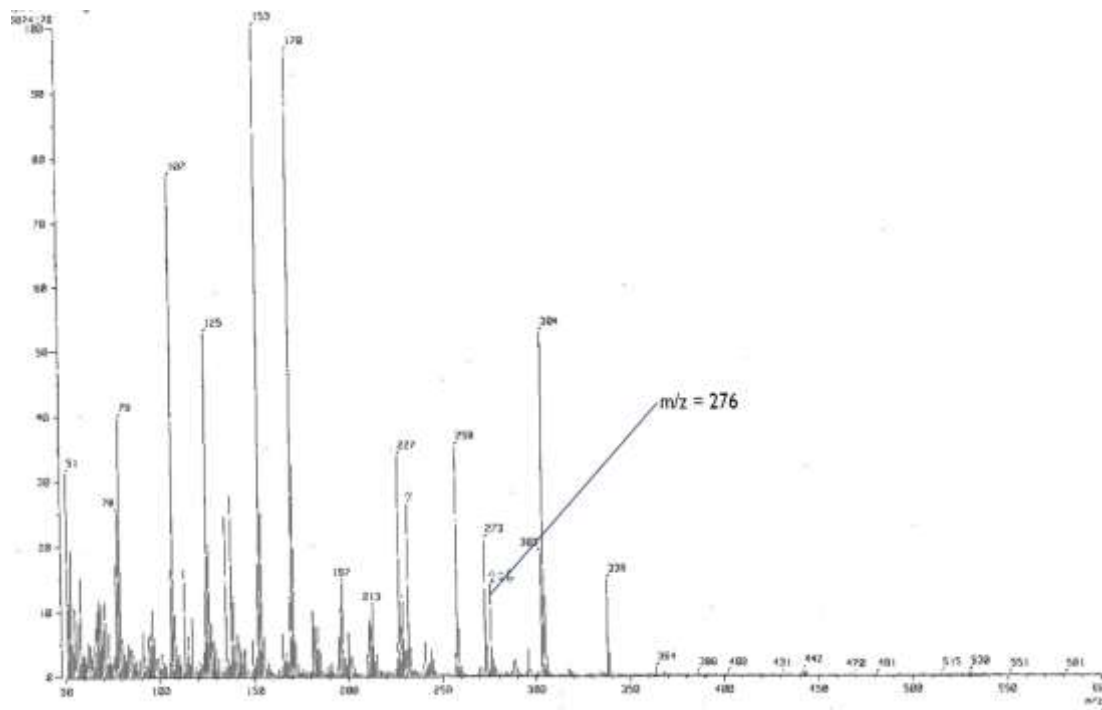
Lampiran 3

Spektrum FT-IR 2-Hidroksi Benzil Galat

Spektrum ¹H NMR 2-Hidroksi Benzil Galat

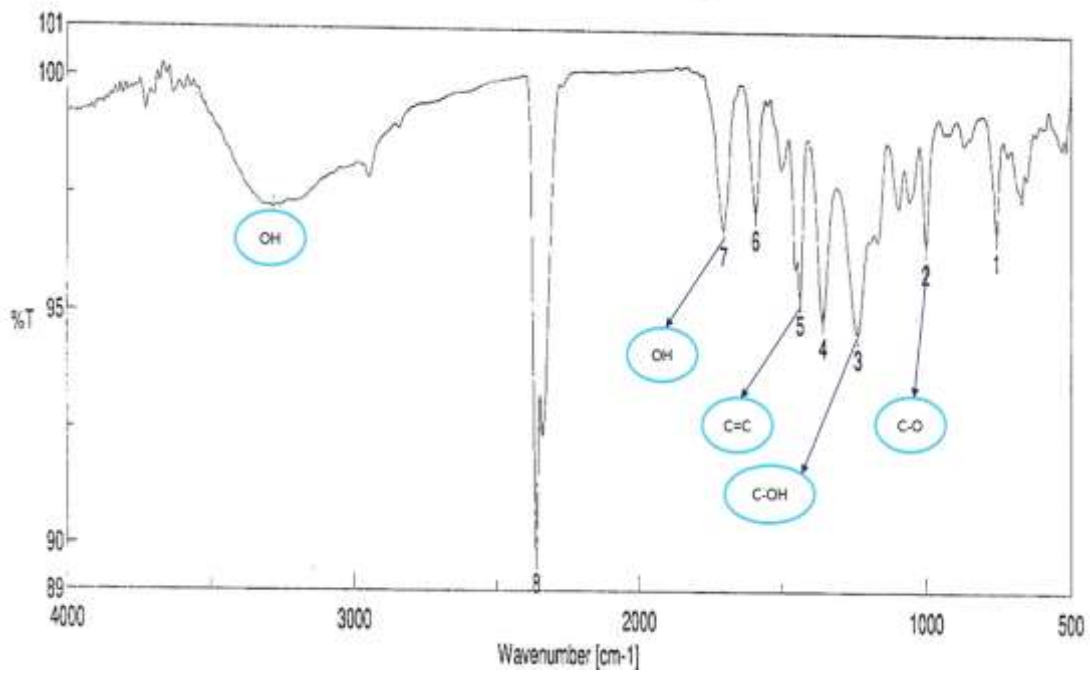
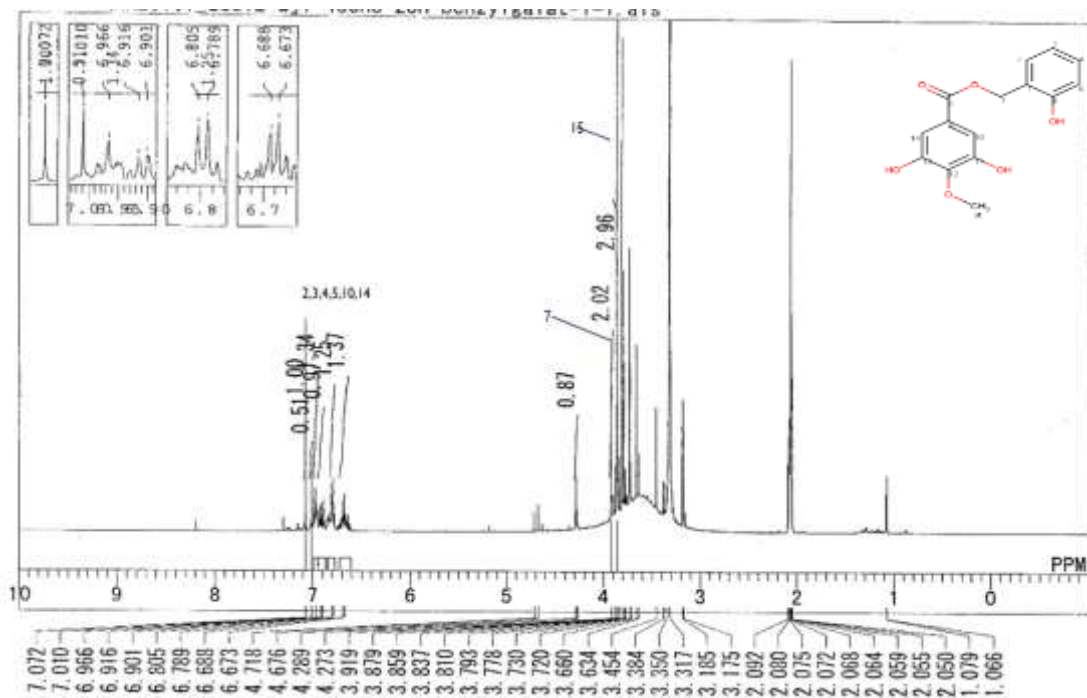
Spektrum ^{13}C NMR 2-Hidroksi Benzil Galat

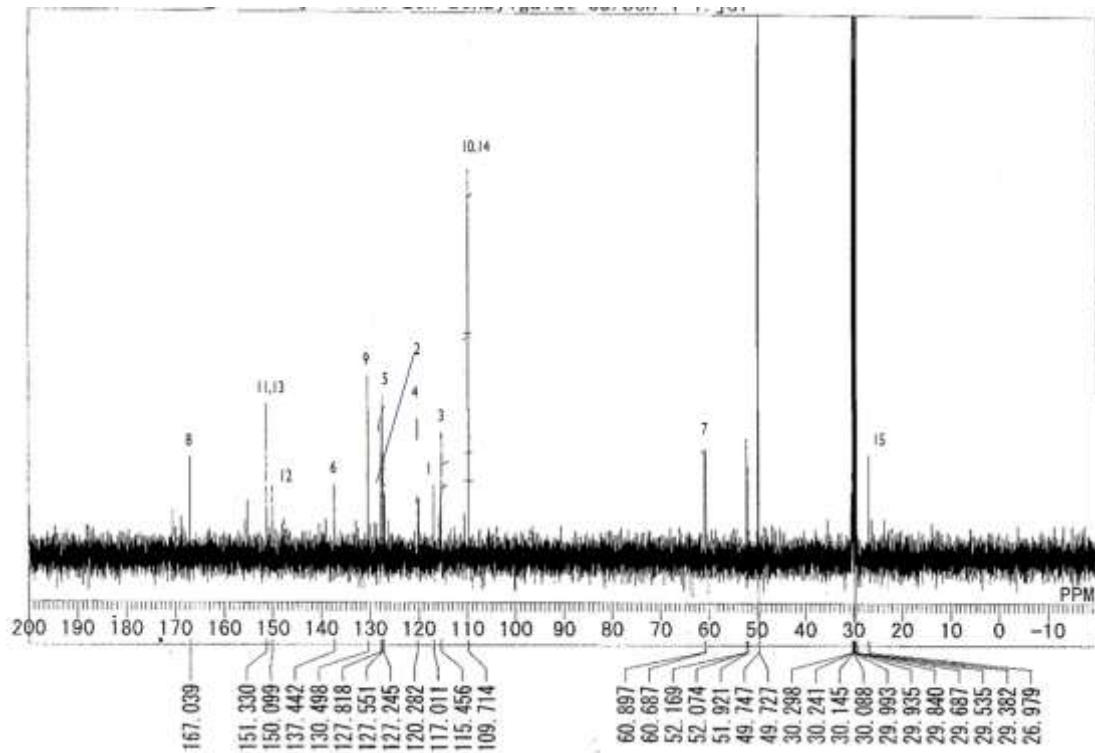
Spektrum Massa 2-Hidroksi Benzil Galat



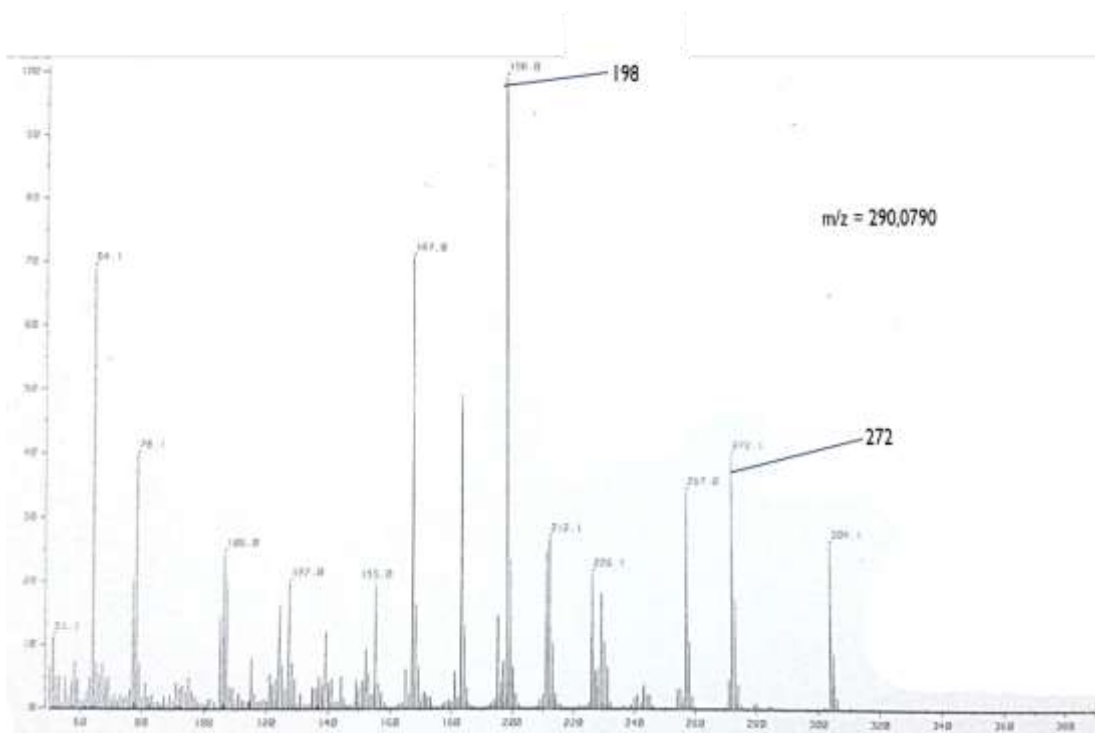
Lampiran 4

Spektrum FT-IR 4-Metoksi-2-Hidroksi-Benzil Galat

Spektrum ¹H NMR 4-Metoksi-2-Hidroksi-Benzil Galat

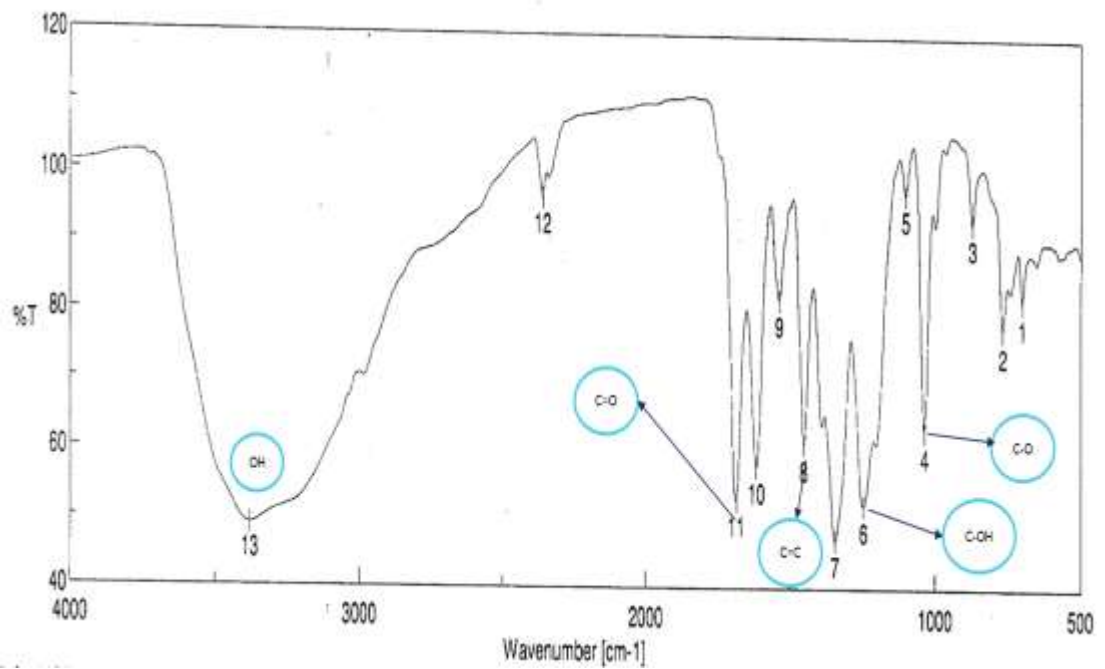
Spektrum ^{13}C NMR 4-Metoksi-2-Hidroksi-Benzil Galat

Spektrum Massa 4-Metoksi-2-Hidroksi-Benzil Galat

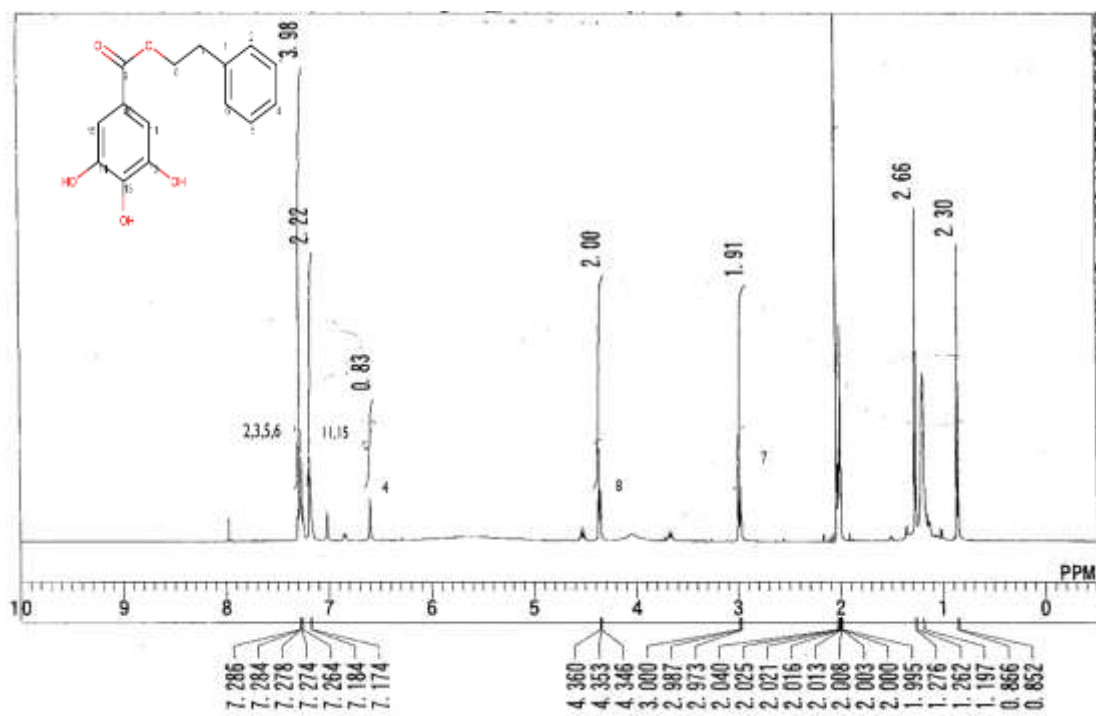


Lampiran 5

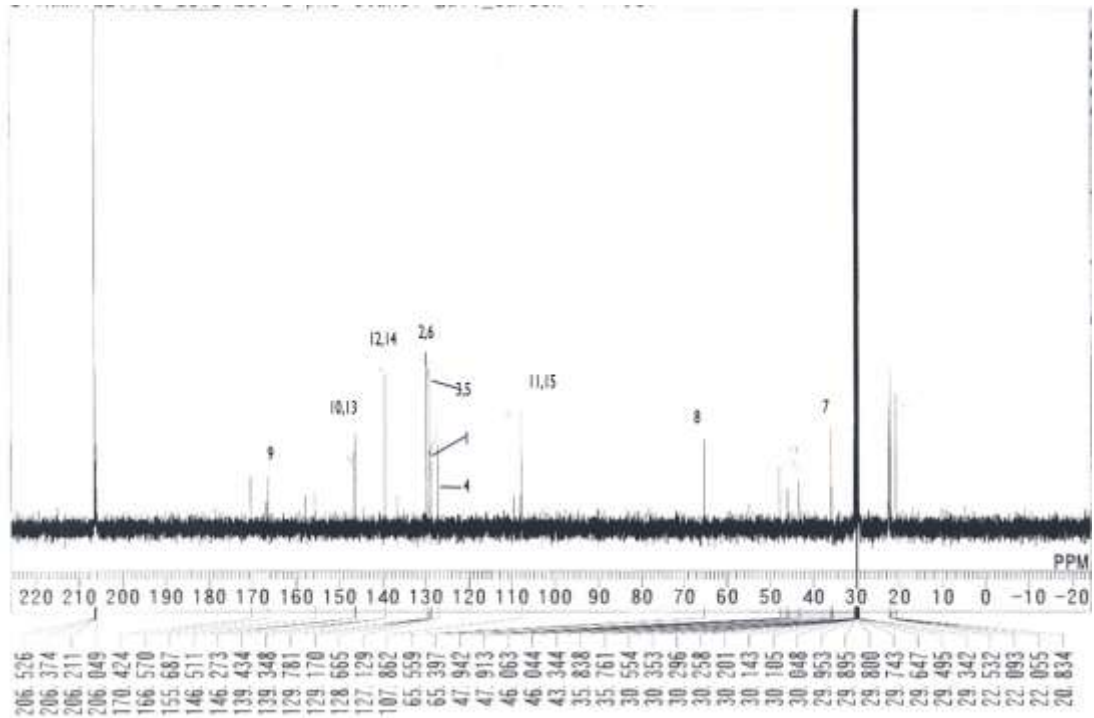
Spektrum FT-IR Feniletil galat



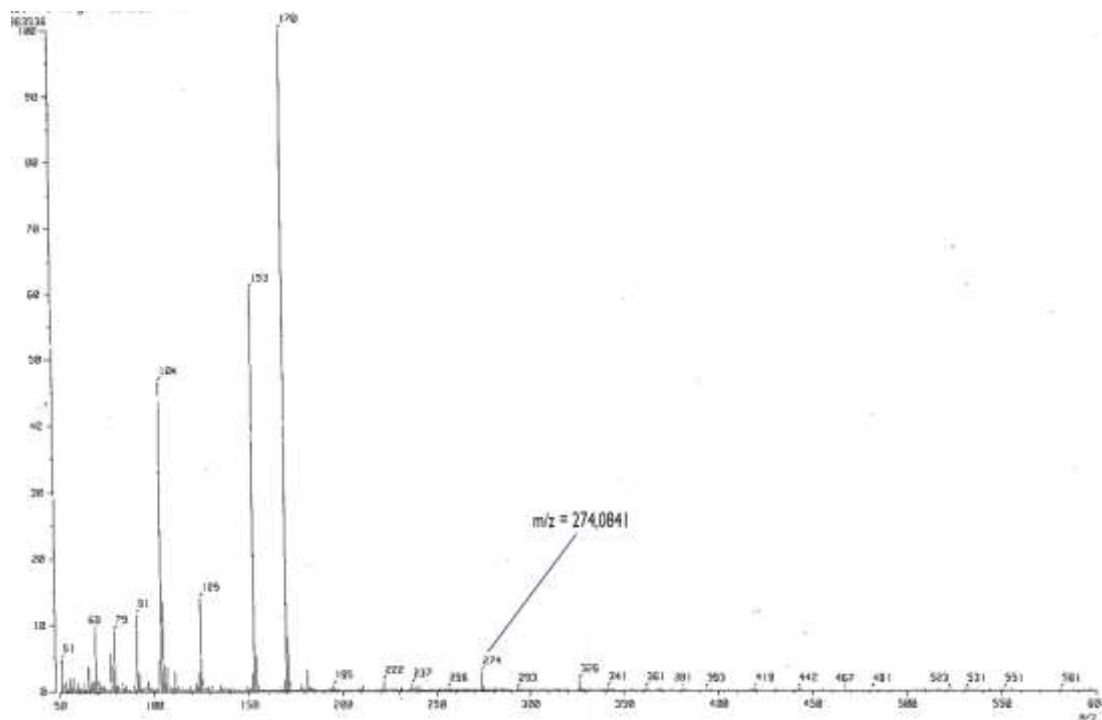
Spektrum HNMR Feniletil Galat



Spektrum ^{13}C NMR Feniletil Galat



Spektrum Massa Feniletil Galat



Lampiran 6

Perhitungan Rendemen Senyawa Sintesis Derivat Asam Galat

1. Senyawa Sintesis Etil Galat

- Berat yang ditimbang

$$\frac{0,5 \text{ g}}{198,17} = 0,0025 \text{ mol}$$

- Berat yang dihasilkan

$$\frac{0,3198 \text{ g}}{198,17} = 0,0016137 \text{ mol}$$

- Rendemen EG

$$\frac{0,0016137}{0,0025} \times 100\% = 64,55\%$$

2. Senyawa Sintesis Benzil Galat

- Berat yang ditimbang :

$$\frac{0,5 \text{ g}}{260,236} = 0,0019 \text{ mol}$$

- Berat yang dihasilkan :

$$\frac{0,3071 \text{ g}}{260,236} = 0,00118 \text{ mol}$$

- Rendemen BG

$$\frac{0,00118}{0,0019} \times 100\% = 62,11\%$$

3. Senyawa Sintesis 2-Hidroksi Benzil Galat

Berat yang ditimbang :

$$\frac{0,25 \text{ g}}{276,236} = 0,0009 \text{ mol}$$

Berat yang dihasilkan :

$$\frac{0,1323 \text{ g}}{276,236} = 0,00047925 \text{ mol}$$

Rendemen 2-hidroksi benzyl galat

$$\frac{0,0004795}{0,0009} \times 100\% = 53,25\%$$

4. Senyawa Sintesis 4-Metoksi-2-Hidroksi Benzil Galat

- Berat yang ditimbang :

$$\frac{0,25 \text{ g}}{290,262} = 0,00086 \text{ mol}$$

- Berat yang dihasilkan :

$$\frac{0,1274 \text{ g}}{290,262} = 0,000439 \text{ mol}$$

- Rendemen 4-Metoksi-2-hidroksi-benzil galat

$$\frac{0,000439}{0,00086} \times 100\% = 51,05\%$$

5. Senyawa Feniletil Galat

- Berat yang ditimbang :

$$\frac{0,25 \text{ g}}{274,262} = 0,0009 \text{ mol}$$

- Berat yang dihasilkan :

$$\frac{0,1451 \text{ g}}{274,262} = 0,000529 \text{ mol}$$

- Rendemen Feniletil galat

$$\frac{0,000529}{0,0009} \times 100\% = 58,87\%$$

Lampiran 7

Perhitungan sampel untuk uji MTT (CCRC, 2013)

- 1 mg sampel ditimbang dalam eppendorf, ditambahkan 50 μL DMSO \rightarrow divortex hingga larut

$$1 \text{ mg} / 50 \mu\text{L} = 20000 \mu\text{g} / 1000 \mu\text{L}$$

$$= 20000 \mu\text{g/mL} \text{ atau } 20000 \text{ ppm}$$
- Dari larutan induk 1 diencerkan menjadi konsentrasi 400 ppm :

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 20000 \mu\text{g/mL} = 1 \text{ mL} \times 400 \mu\text{g/mL}$$

$$V_1 = 0,02 \text{ mL}$$

$$= 20 \mu\text{L} + \text{DMEM } 980 \mu\text{L}$$
- Dari larutan induk 2 diencerkan menjadi beberapa seri konsentrasi (200 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 12,5 ppm, 6,25 ppm, 3,12 ppm, 1,56 ppm, 0,78 ppm)
 - Pembuatan konsentrasi 200 ppm (1) :

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 400 \mu\text{g/mL} = 1 \text{ mL} \times 200 \mu\text{g/mL}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ mL} + \text{DMEM } 0,5 \text{ mL}$$
 - Pembuatan konsentrasi 100 ppm (2) :

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 200 \mu\text{g/mL} = 1 \text{ mL} \times 100 \mu\text{g/mL}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ mL} + \text{DMEM } 0,5 \text{ mL}$$
 - Pembuatan konsentrasi 50 ppm (3) :

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 100 \mu\text{g/mL} = 1 \text{ mL} \times 50 \mu\text{g/mL}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ mL} + \text{DMEM } 0,5 \text{ mL}$$
 - Pembuatan konsentrasi 25 ppm (4) :

$$V_1 \times N_1 (3) = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 50 \mu\text{g/mL} = 1 \text{ mL} \times 25 \mu\text{g/mL}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ mL} + \text{DMEM } 0,5 \text{ mL}$$
 - Pembuatan konsentrasi 12,5 ppm (5) :

$$V_1 \times N_1 (4) = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 25 \mu\text{g/mL} = 1 \text{ mL} \times 12,5 \mu\text{g/mL}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ mL} + \text{DMEM } 0,5 \text{ mL}$$
 - Pembuatan konsentrasi 6,25 ppm (6) :

$$V1 \times N1 (5) = V2 \times N2$$

$$V1 \times 12,5 \mu\text{g/mL} = 1 \text{ mL} \times 6,25 \mu\text{g/mL}$$

$$V1 = 0,5 \text{ mL} + \text{DMEM } 0,5 \text{ mL}$$

- Pembuatan konsentrasi 3,12 ppm (7) :

$$V1 \times N1 (6) = V2 \times N2$$

$$V1 \times 6,25 \mu\text{g/mL} = 1 \text{ mL} \times 3,12 \mu\text{g/mL}$$

$$V1 = 0,5 \text{ mL} + \text{DMEM } 0,5 \text{ mL}$$

- Pembuatan konsentrasi 1,56 ppm (8) :

$$V1 \times N1 (7) = V2 \times N2$$

$$V1 \times 3,12 \mu\text{g/mL} = 1 \text{ mL} \times 1,56 \mu\text{g/mL}$$

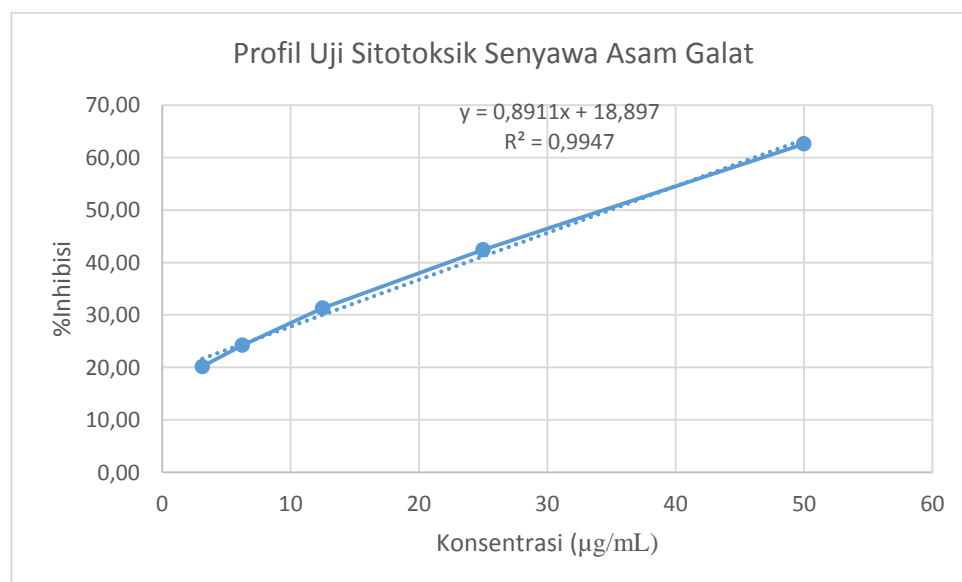
$$V1 = 0,5 \text{ mL} + \text{DMEM } 0,5 \text{ mL}$$

Lampiran 8

Perhitungan IC₅₀

1. Data Absorbansi Sel Kontrol dan Senyawa Asam Galat

Asam Galat					
Konsentrasi	Absorbansi Sampel			Rata-rata	%Inhibisi
	OD1	OD2	OD3		
3.125	0.158	0.160	0.157	0.158	20.0337
6.25	0.150	0.149	0.152	0.150	24.0741
12.5	0.138	0.136	0.135	0.136	31.1448
25	0.116	0.115	0.112	0.114	42.2559
50	0.074	0.074	0.074	0.074	62.6263
Sel Kontrol	0.210	0.196	0.188	0.198	0.0000



Dari grafik persamaan dapat dihitung nilai IC₅₀ senyawa asam galat adalah :

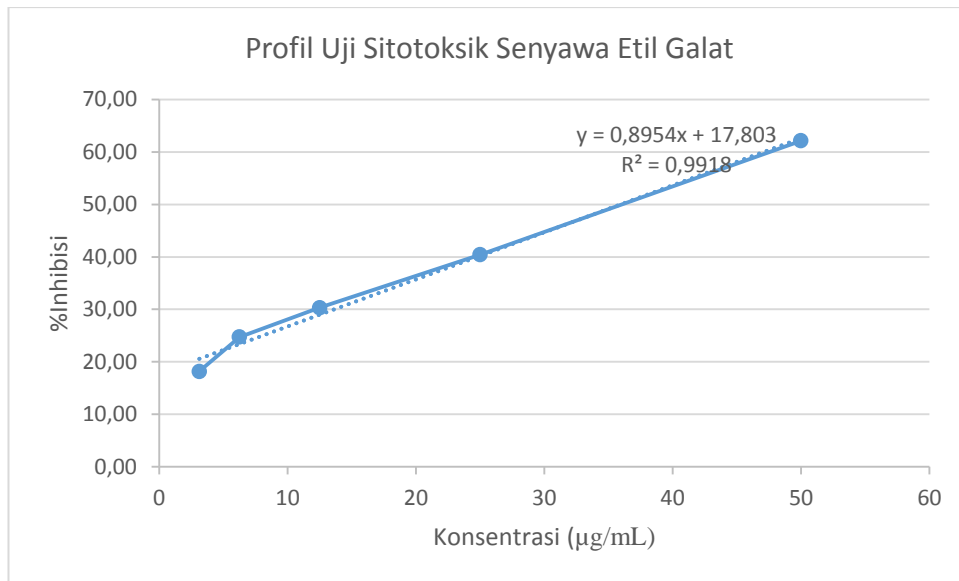
$$Y = 18,897 + 0,8911x$$

Jika Y = 50

$$\text{Maka : } X = \frac{50 - a}{b} = \frac{50 - 18,897}{0,8911} = 34,91 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Jadi IC₅₀ senyawa asam galat adalah 34,91 µg/mL

2. Senyawa etil galat



Dari grafik persamaan dapat dihitung nilai IC_{50} senyawa etil galat adalah :

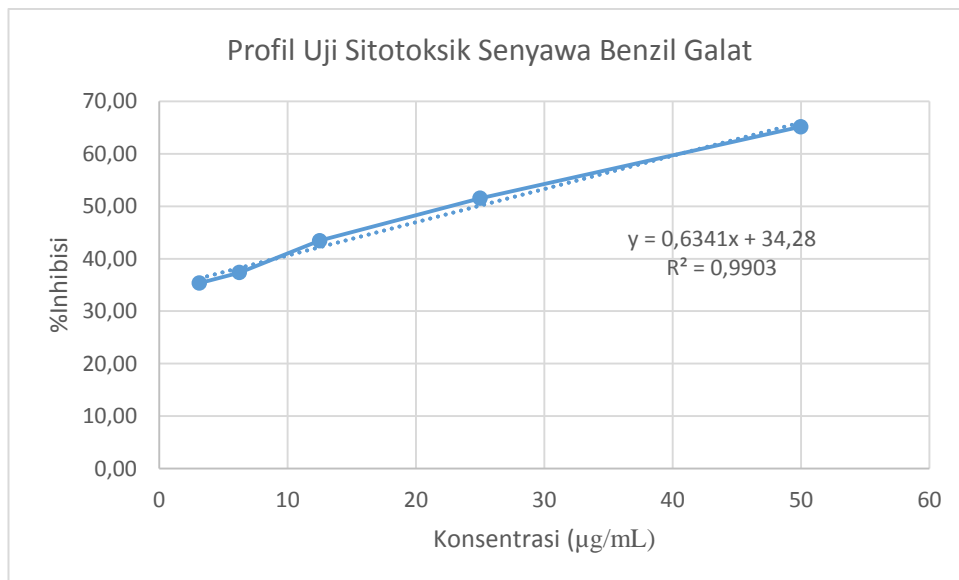
$$Y = 17,803 + 0,8954x$$

Jika $Y = 50$

$$\text{Maka : } X = \frac{50 - a}{b} = \frac{50 - 17,803}{0,8954} = 35,96 \mu\text{g/mL}$$

Jadi IC_{50} senyawa etil galat adalah 35,96 $\mu\text{g/mL}$

3. Senyawa benzil galat



Dari grafik persamaan dapat dihitung nilai IC_{50} senyawa benzil galat adalah :

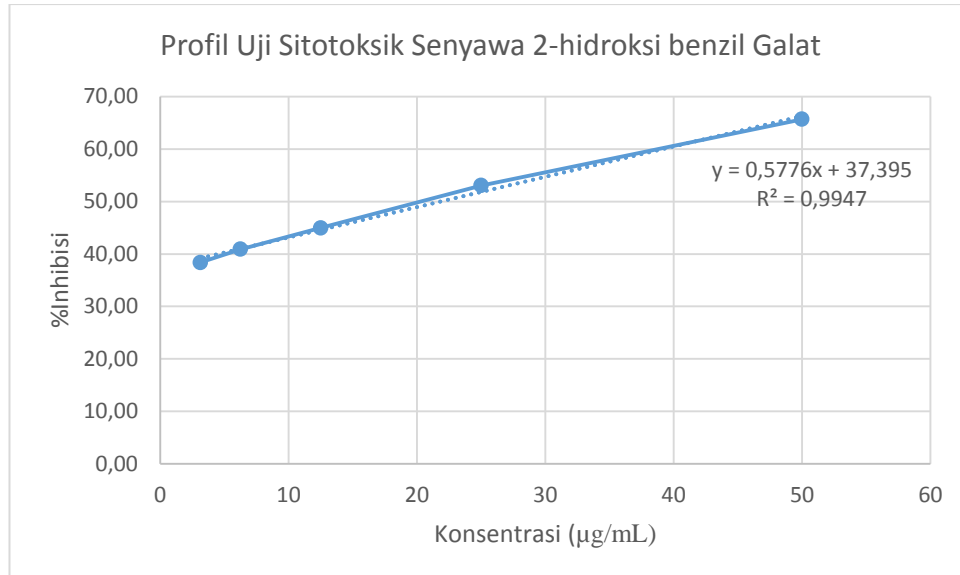
$$Y = 34,28 + 0,6341x$$

Jika $Y = 50$

$$\text{Maka : } X = \frac{50-a}{b} = \frac{50-34,28}{0,6341} = 24,79 \mu\text{g/mL}$$

Jadi IC_{50} senyawa benzil galat adalah 24,79 $\mu\text{g/mL}$

4. Senyawa 2-hidroksi benzil galat



Dari grafik persamaan dapat dihitung nilai IC_{50} senyawa 2-hidroksi benzil galat adalah :

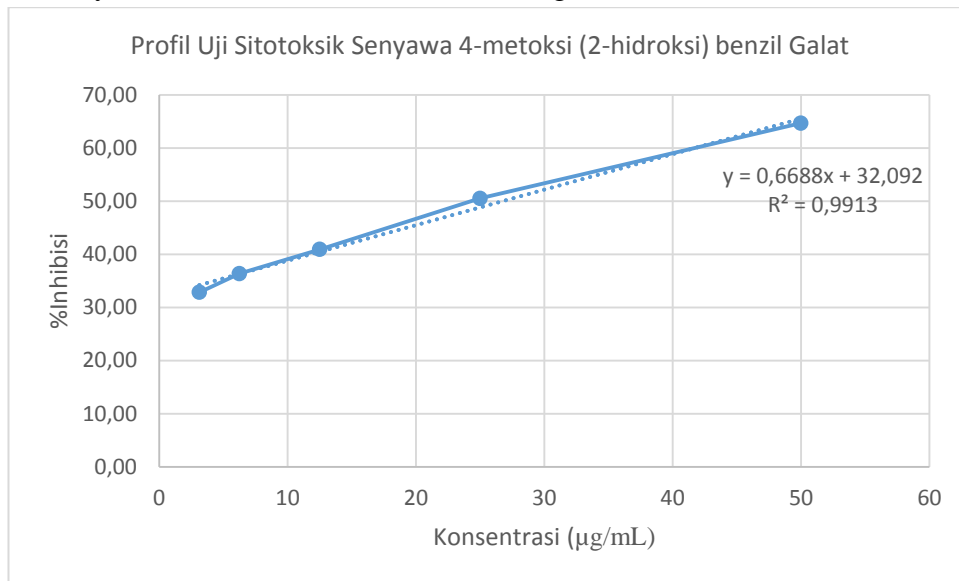
$$Y = 37,395 + 0,5776x$$

Jika $Y = 50$

$$\text{Maka : } X = \frac{50-a}{b} = \frac{50-37,395}{0,5776} = 21,82 \mu\text{g/mL}$$

Jadi IC_{50} senyawa 2-hidroksi benzil galat adalah 21,82 $\mu\text{g/mL}$

5. Senyawa 4-metoksi (2-hidroksi) benzil galat



Dari grafik persamaan dapat dihitung nilai IC_{50} senyawa asam galat adalah :

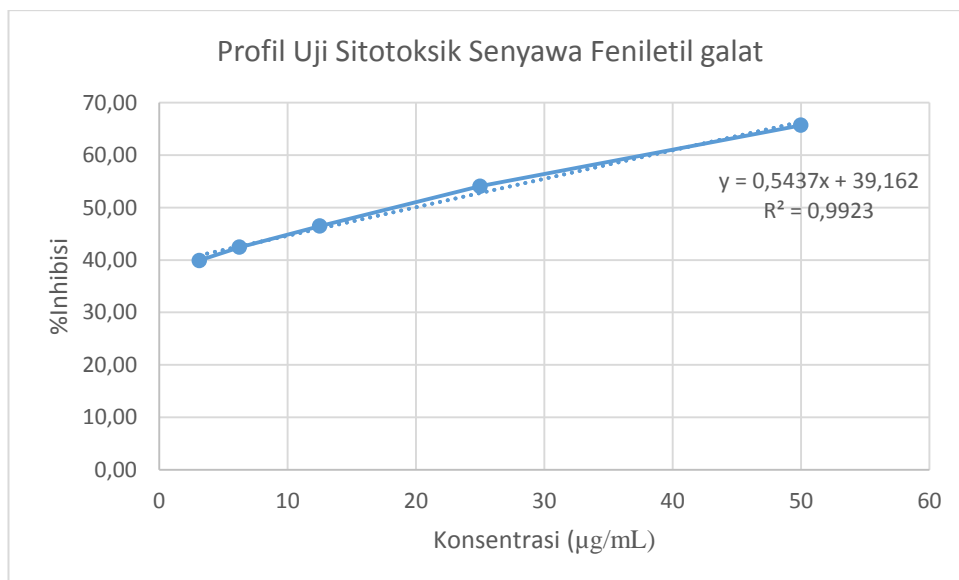
$$Y = 32,092 + 0,6688x$$

Jika $Y = 50$

$$\text{Maka : } X = \frac{50 - a}{b} = \frac{50 - 32,092}{0,6688} = 26,98 \mu\text{g/mL}$$

Jadi IC_{50} senyawa 4-metoksi (2-hidroksi) benzil galat adalah 26,98 µg/mL

6. Senyawa feniletilgalat



Dari grafik persamaan dapat dihitung nilai IC_{50} senyawa asam galat adalah :

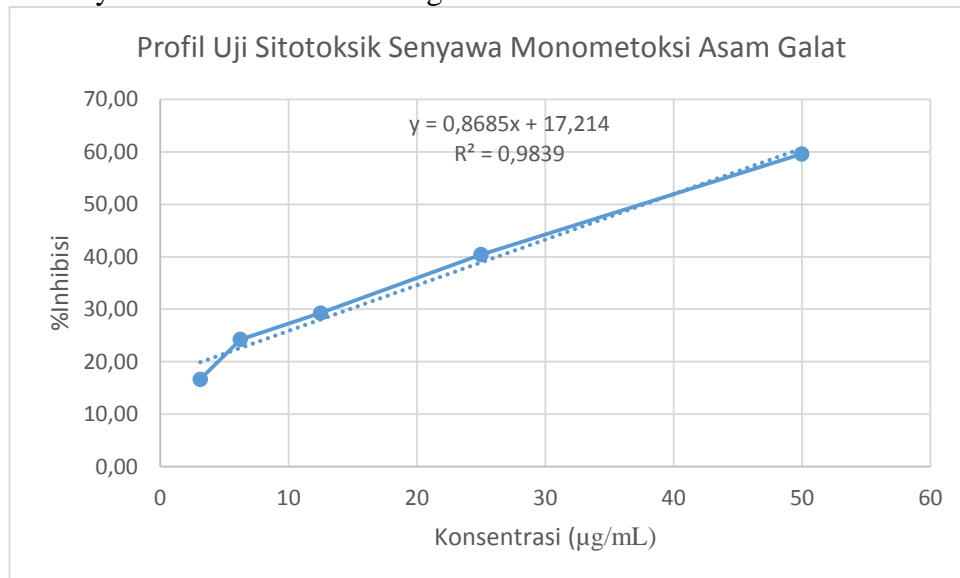
$$Y = 39,162 + 0,5437x$$

Jika $Y = 50$

$$\text{Maka : } X = \frac{50-a}{b} = \frac{50-39,162}{0,5437} = 19,93 \mu\text{g/mL}$$

Jadi IC_{50} senyawa feniletil galat adalah $19,93 \mu\text{g/mL}$

7. Senyawa monometoksi asam galat



Dari grafik persamaan dapat dihitung nilai IC_{50} senyawa asam galat adalah :

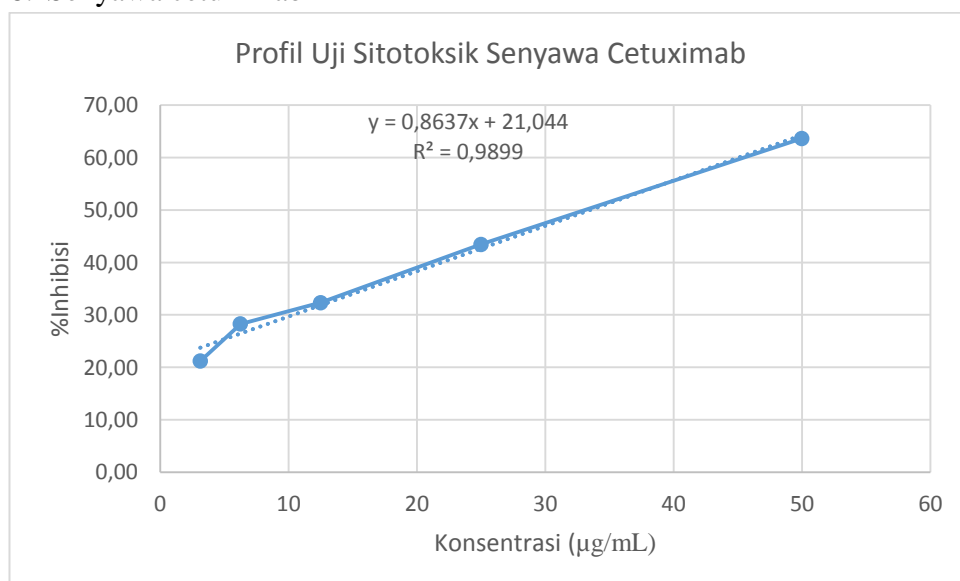
$$Y = 17,214 + 0,8685x$$

Jika $Y = 50$

$$\text{Maka : } X = \frac{50-a}{b} = \frac{50-17,214}{0,8685} = 37,75 \mu\text{g/mL}$$

Jadi IC_{50} senyawa monometoksi asam galat adalah $37,75 \mu\text{g/mL}$

8. Senyawa cetuximab



Dari grafik persamaan dapat dihitung nilai IC_{50} senyawa asam galat adalah :

$$Y = 21,044 + 0,8637x$$

Jika $Y = 50$

$$\text{Maka : } X = \frac{50-a}{b} = \frac{50-21,044}{0,8637} = 33,53 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Jadi IC_{50} senyawa cetuximab adalah 33,53 $\mu\text{g/mL}$