

## Sintesis Artemeter dengan Katalis Bifungsional dalam Satu Sistem Reaksi dan Uji Aktivitas Sitotoksik Terhadap Sel Leukimia L1210

### (Synthesis of Artemether by Bifunctional Catalyst in One Pot Reaction System and Cytotoxicity Test Against L1210 Leukemia Cells)

LIA NURLIANA<sup>1</sup>, HARMITA<sup>1</sup>, SILVESTER S. TURSILOADP<sup>2</sup>, L.B.S KARDONO<sup>3,4\*</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Ilmu kefarmasian, FMIPA Universitas Indonesia, Kampus UI Depok, Depok 16424

<sup>2</sup>Pusat Penelitian Kimia LIPI, Kawasan PUSPIPTEK Serpong, 15314

<sup>3</sup>International Center for Interdisciplinary and Advanced Research, LIPI, Jl. Gator Subroto 10, Jakarta 12710

<sup>4</sup>Program Pasca Sarjana Farmasi, Universitas Pancasila, Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta 12640

Diterima 28 Agustus 2011, Disetujui 16 Maret 2012

**Abstrak:** Artemisinin dikenal sebagai obat herbal dari Cina yang diisolasi dari tanaman *Artemisia annua* L. Artemisinin dikenal sebagai obat demam dan antimalaria, selain itu artemisinin dan turunannya juga berpotensi sebagai antikanker. Hal ini karena artemisinin merupakan senyawa sesquiterpen lakton dengan gugus unik peroksida. Penelitian ini bertujuan memodifikasi struktur artemisinin menjadi artemeter menggunakan katalis padat Ni/TiO<sub>2</sub>-SO<sub>4</sub> melalui proses hidrogenasi dan metilasi alkohol dalam satu wadah reaksi dan menguji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel leukemia L1210 secara *in vitro*. Katalis padat yang digunakan pada penelitian ini tersusun dari logam Ni sebagai pusat aktif, TiO<sub>2</sub> sebagai penyangga katalis dan sulfat sebagai promotor. Artemeter yang dihasilkan berupa kristal putih dengan rendemen sebesar 1,29% sebagai minor produk dan masih terdapat senyawa intermediet yaitu dihidroartemisinin dengan rendemen sebesar 19%. Artemeter hasil sintesis mempunyai aktivitas antikanker terhadap sel leukemia L1210 dengan nilai IC<sub>50</sub> 3,07 µg/mL, sehingga artemeter hasil sintesis berpotensi sebagai senyawa antikanker.

**Kata kunci:** artemisinin, artemeter, katalis padat Ni/TiO<sub>2</sub>-SO<sub>4</sub>, sitotoksik.

**Abstract:** Artemisinin has been known as herbal medicine from China, which was isolated from the *Artemisia annua* L. plant. Artemisinin was originally known as antipyretic and antimalarial drug. Artemisinin and its derivatives also have potential as anticancer, due to the sesquiterpene lactone containing a unique peroxide group. This study aimed to modify the structure of artemisinin into artemether using solid catalyst Ni/TiO<sub>2</sub>-SO<sub>4</sub> through the hydrogenation and methylation of the alcohol group in one pot reaction system. The product was then investigated for its cytotoxic activity against L1210 leukemia cells. The solid catalyst in this study was composed of metallic Ni as the active center, TiO<sub>2</sub> as a catalyst support and sulphate as the promoter. The modification of artemisinin produced 1.29% artemether white crystals as a minor product, and 19% dihydroartemisinin as an intermediate compound. The synthesized artemether showed an anticancer activity against L1210 leukemia cells with IC<sub>50</sub> value of 3.07 µg / mL. The result suggests that the synthesized artemether has a potency as an anticancer.

**Keywords:** artemisinin, artemether, Ni/TiO<sub>2</sub>-SO<sub>4</sub> solid catalyst, cytotoxic.

\* Penulis korespondensi, Hp. 0812879338  
e-mail: leon001@lipi.go.id

## PENDAHULUAN

KANKER merupakan penyebab kematian kedua setelah penyakit kardiovaskular. Kanker di Amerika merupakan penyebab utama kematian terhadap wanita berumur 30-54 tahun dan anak-anak berumur 3-14 tahun<sup>(1)</sup>. Salah satu hambatan dari terapi kanker dengan sitostatika adalah timbulnya masalah resistensi. Berbagai jenis tumor cenderung mengalami resistensi yang disebabkan oleh mutasi genetik dan lebih nyata meningkatnya jumlah sel-sel tumor. Ternyata diketahui bahwa sitostatika sendiri dapat meningkatkan kecenderungan resistensi tersebut, sehingga perlu adanya kombinasi obat kanker atau sitostatika. Kombinasi tiga atau lebih sitostatika sering kali digunakan obat dengan mekanisme dan titik kerja yang berlainan, sehingga cara kerjanya saling dipotensiasi dan terjadinya resistensi dapat dihindari atau diperlambat<sup>(2)</sup>.

Adanya kasus seperti tersebut, maka diperlukan pengembangan obat antikanker baru, agar diperoleh senyawa antikanker yang ideal yang bersifat lebih aman dan sel kanker tidak mengalami resistensi terhadap obat tersebut. Artemisinin dan turunannya (Gambar 1) selain dikenal sebagai obat demam dan obat antimalaria juga sudah dikenal sebagai obat antikanker yang sangat baik karena artemisinin dikenal sebagai obat alternatif yang aman, tidak beracun dan murah untuk pasien kanker<sup>(3,4)</sup>.

Aplikasi klinik artemisinin sebagai *therapeutic agent* dibatasi oleh beberapa faktor yakni aktivitas oralnya rendah pada dosis yang dikehendaki, waktu paruh di plasma rendah dan kelarutannya terbatas, baik dalam air maupun dalam minyak. Oleh karena itu, usaha untuk mengatasi masalah terapi dan farmasi ini, antara lain melalui modifikasi struktur kimia artemisinin menjadi senyawa analognya dan diharapkan akan memberikan kelebihan dan beberapa keuntungan dibandingkan senyawa induknya. Salah satu turunan artemisinin yang larut air adalah dihidroartemisinin,

sedangkan artemeter merupakan turunan yang larut minyak<sup>(5,6)</sup>.

Berdasarkan penelitian sebelumnya mengungkapkan bahwa aktivitas dihidroartemisinin dan artemeter secara berturut-turut memiliki aktivitas 5 kali dan 9 kali lebih tinggi dibanding artemisinin<sup>(7,8,9)</sup>.

Penelitian ini bertujuan memodifikasi struktur artemisinin menjadi artemeter menggunakan katalis padat Ni/TiO<sub>2</sub>-SO<sub>4</sub> melalui proses hidrogenasi dan metilasi alkohol dalam satu wadah reaksi<sup>(10)</sup>. Pada penelitian sebelumnya sintesis artemeter dilakukan dengan dua tahapan, dan berbeda dengan penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya, pada penelitian ini, artemeter disintesis menggunakan katalis padat bifungsional melalui sistem satu-reaktor<sup>(11)</sup>.

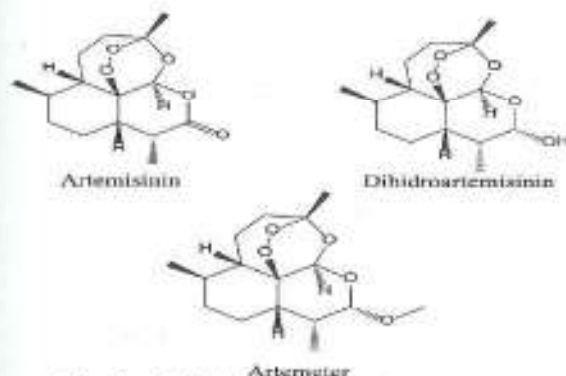
## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Artemisinin dari PT.Sinkona Indonesia Lestari, titanium iso propoksida (Fluka chemica), nikel (II) nitrat, asam sulfat, asam nitrat, n-propanol, KBr, CTAB, metanol, gas hidrogen HP, kloroform, etil asetat, asam format, heksana, toluen, DMSO, anisaldehyda, silika gel 60 GF<sub>254</sub>, RPMI-1640L-glutamin, NaHCO<sub>3</sub>, *calf bovine serum* dan sel leukemia L1210, pelat KLT Si gel 60F<sub>254</sub> (Merck).

**Alat.** Alat refluks, kromatografi kolom, spektrofotometer infra merah (Perkin Elmer 16 PC, FTIR, Prestige-21 Shimadzu), *hot plate*, *oven vacuum*, XRD, reaktor hidrogenasi, penguap putar, Resonansi Magnet Inti (500 MHz, Jeol), Kromatografi Cair-Spektrometri Massa Mariner Biorad (70 ev), alat reduksi katalis (*Tube furnace* 21100), *furnace* 6000 (*thermolyne*).

**METODE. Preparasi katalis.** Preparasi katalis dilakukan dengan cara melarutkan 9,25 mL titanium iso-propoksida dalam 14,45 mL n-propanol kemudian diaduk dengan menggunakan pengaduk magnetik pada suhu 0°C, dan setelah homogen ditambahkan larutan HNO<sub>3</sub> 65%, hingga pH = 3, kemudian ditambahkan larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat sampai merata. Setelah itu, larutan tersebut direfluks pada suhu 70°C selama 5 jam dengan dilengkapi pendingin. Setelah proses refluks selesai, tetes demi tetes air ditambahkan pada larutan tersebut sampai terbentuk sol gel padat. Sol gel yang terbentuk direndam dengan larutan CTAB selama 24 jam, lalu didekantasi. Setelah itu sol gel basah dikeringkan dalam vakum pengering pada suhu 70°C selama 24 jam. Gel yang telah kering dikalsinasi dengan menggunakan tanur secara bertahap pada suhu 150°C selama 2 jam; 225°C selama 2 jam, dan 500°C selama 4 jam, sehingga diperoleh katalis TiO<sub>2</sub>-SO<sub>4</sub><sup>(10)</sup>.

Proses impregnasi dilakukan dengan cara membuat larutan Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0,05M dalam *aguades* kemudian



Gambar 1. Artemisinin dan turunannya.

dicampur dengan katalis  $Ti-SO_2$  hasil kalsinasi dengan pengadukan secara perlahan hingga terbentuk *slurry* berwarna hijau muda. Setelah itu katalis hasil impregnasi dipanaskan pada suhu  $70^\circ C$  selama 3 jam kemudian dikalsinasi sehingga diperoleh katalis  $Ni/TiO_2-SO_2$  hasil impregnasi berupa serbuk berwarna hijau muda. Katalis hasil impregnasi dimasukkan ke dalam peralatan gelas perangkat pada proses reduksi, kemudian dengan dialiri gas hidrogen selama 3 jam pada suhu  $300^\circ C$  maka diperoleh katalis hasil reduksi yang berupa serbuk hitam kelam<sup>(11)</sup>.

**Sintesis turunan artemisinin.** Artemisinin hasil isolasi sebanyak 100 mg dicampurkan dengan 30 mL metanol dan 10 mg katalis  $Ni/TiO_2-SO_2$ . Kemudian campuran dimasukkan dalam reaktor lalu diaduk dan dipanaskan pada suhu konstan  $100^\circ C$  dengan dialiri gas hidrogen pada suhu yang sama selama 5 jam pada tekanan konstan 5 bar. Produk hasil sintesis disaring dengan menggunakan kertas saring untuk memisahkan dari katalis padat lalu diuapkan.

**Identifikasi turunan artemisinin dengan KLT.** Larutan pengembang yang digunakan untuk identifikasi turunan artemisinin adalah toluen-etil asetat-asam format (7:3:1) yang dimasukkan ke dalam bejana kromatografi lalu dijenuhkan beberapa menit. Hasil sintesis turunan artemisinin ditotolkan pada lempeng kromatografi lapis tipis lalu dimasukkan dalam bejana yang telah jenuh dengan pelarut, lalu dielusi sampai garis batas. Setelah lempeng KLT kering disemprot dengan larutan anisaldehyd, sehingga dihasilkan bercak yang kemudian dibandingkan dengan senyawa standar artemisinin, dan dihitung  $R_f$  masing-masing senyawa hasil sintesis.

**Pemurnian hasil sintesis dengan menggunakan kromatografi kolom.** Hasil sintesis dimurnikan menggunakan kromatografi kolom dengan metode elusi gradien. Berturut turut pelarut yang digunakan adalah heksana, heksana-1% etil asetat, heksana-2% etil asetat, heksana-5% etil asetat, heksana-10% etil asetat, dan heksana 15% etil asetat. Hasil elusi ditampung dalam vial-vial kecil sampai seluruh senyawa terelusi. Hasil pemisahan dengan fase gerak heksana diidentifikasi dengan KLT menggunakan larutan pengembang 4% etil asetat dalam heksana, sedangkan hasil pemisahan dengan campuran heksana-etil asetat diidentifikasi menggunakan larutan pengembang toluen-etil asetat-asam format (7:3:1). Anisaldehyd digunakan untuk pewarnaan dengan disemprotkan pada lempeng KLT, atau bercak pada lempeng KLT diidentifikasi di bawah sinar lampu UV 256 nm dan 365 nm.

**Identifikasi artemeter.** Spektrum IR dan spektrum  $^1H-NMR$  senyawa hasil sintesis dibandingkan dengan spektrum IR dan spektrum  $^1H-NMR$  senyawa artemisinin. Spektrum MS senyawa hasil sintesis

diperoleh dengan ESI-MS menggunakan *Mariner Mass Spectrometer*. Spektrum MS ini dapat menunjukkan massa ion molekul sebagai  $m/z = (M+1)$ , sehingga dapat diketahui bobot molekul (BM) senyawa hasil sintesis<sup>(12)</sup>.

**Uji toksisitas dengan larva udang (*Artemia Salina* Leach).** Larva udang yang hidup sebanyak 10 ekor dimasukkan ke dalam vial uji yang berisi 100  $\mu L$  air laut. Ditambahkan larutan artemeter yang akan diuji masing-masing sebanyak 100  $\mu L$ , sehingga konsentrasi akhir 10, 50, 100, 200, 500, 1000 ppm. Larutan digoyangkan sampai homogen. Setiap konsentrasi artemeter dilakukan 3 kali pengulangan. Kontrol dilakukan tanpa penambahan larutan artemeter, kemudian dibiarkan selama 24 jam. Dihitung jumlah larva yang mati dan yang masih hidup. Selanjutnya tingkat mortalitas dihitung dengan membandingkan antara jumlah larva yang mati dibagi dengan jumlah total larva<sup>(13)</sup>.

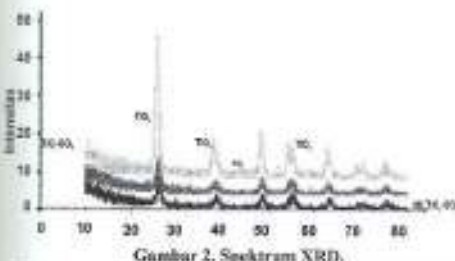
**Uji aktivitas sitotoksik terhadap sel leukemia L1210.** Media RPMI-1640 dibuat dari 10,4 g yang mengandung L-glutamin dilarutkan dalam 1 L air steril (A). Kemudian 1,3 g  $NaHCO_3$  dilarutkan dalam 50 mL air steril (larutan B). Sebanyak 25 mL larutan B ditambahkan ke dalam 475 mL larutan A, maka diperoleh 500 mL media (C). Untuk keperluan uji, 15 mL *calf bovine serum* ditambahkan ke dalam 85 mL larutan C. Semua pekerjaan dilakukan di ruang steril. Sel leukemia L1210 disuspensikan ke dalam media yang telah mengandung *calf bovine serum* sehingga jumlah sel sekitar  $2 \times 10^5$  sel/mL. Sel leukemia L1210 yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari *The Institute of Physical and Chemical Research Jepang*<sup>(14)</sup>.

Pengujian aktivitas sitotoksik artemeter dilakukan dengan variasi dosis 1, 2, 4, 8, 16  $\mu g/mL$  DMSO, media yang telah mengandung suspensi sel leukemia L1210 ( $2 \times 10^5$  sel/mL) dan zat uji dimasukkan ke dalam *multi well plate tissue's culture* sehingga volume total 1 mL dalam setiap sumuran. Sebagai kontrol digunakan 10  $\mu L$  DMSO yang telah ditambahkan 990  $\mu L$  suspensi sel. Percobaan dilakukan duplo, selanjutnya suspensi sel yang telah diisi zat uji diinkubasi selama 48 jam pada suhu  $37^\circ C$  dalam inkubator 5%  $CO_2$ . Perhitungan sel dilakukan menggunakan *haemocytometer Neubauer Improved*. Untuk membedakan antara sel hidup dengan sel mati maka sebelum dilakukan penghitungan, 90  $\mu L$  suspensi dimasukan ke dalam *sero cluster plate* (96 sumuran) dan ditambah 10  $\mu L$  larutan 1% trypan blue sebagai pewarna sel kemudian dihomogenkan. Sebanyak 10  $\mu L$  larutan dialirkan ke dalam *haemocytometer Neubauer Improved*. Setelah itu jumlah sel yang masih hidup dihitung di bawah mikroskop. Sel hidup terlihat sebagai bulatan bening dengan bintik biru inti sel di tengah bulatan, sedangkan sel mati terlihat sebagai bercak biru pekat yang bentuknya tidak teratur.

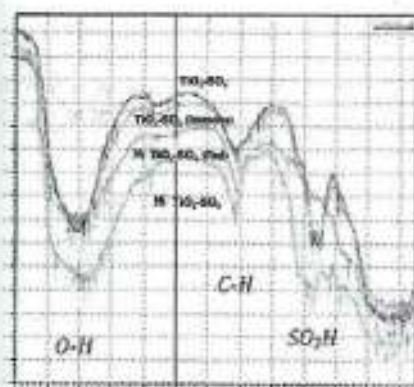
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Perlakuan seperti pengeringan, kalsinasi dan reduksi berpengaruh terhadap luas permukaan, spesies nikel dan ukuran partikel nikel pada katalis yang dibuat. Oleh karena itu pada penelitian ini dilakukan pengukuran terhadap luas permukaan dan difraksi sinar-X pada setiap tahap perlakuan tersebut, sehingga karakteristik dari perlakuan tersebut dapat dipelajari. Karakterisasi katalis Ni/TiO<sub>2</sub>-SO<sub>4</sub> pada penelitian ini menggunakan XRD, BET dan FTIR.

Hasil analisa katalis TiO<sub>2</sub>-SO<sub>4</sub> dan Ni/TiO<sub>2</sub>-SO<sub>4</sub> menggunakan XRD (Gambar 2) dan berdasarkan hasil perhitungan dengan menggunakan persamaan Debye-Scherrer diperoleh ukuran kristalin Ni/TiO<sub>2</sub>-SO<sub>4</sub> sebesar 9,4 nm dan katalis TiO<sub>2</sub>-SO<sub>4</sub> sebelum diimpregnasi juga berbentuk kristalin partikel dengan nilai 11,23 nm.



Gambar 2. Spektrum XRD.

(Keterangan : Kurung: katalis TiO<sub>2</sub>-SO<sub>4</sub> dan Ni; Ni/TiO<sub>2</sub>-SO<sub>4</sub>)

Gambar 3. Hasil analisa FTIR pada katalis.

Tabel 1. Hasil BET dari katalis Ni/TiO<sub>2</sub>-SO<sub>4</sub>.

Sampel	Luas Permukaan Spesifik (m <sup>2</sup> /g)	Volume Pori Total (cm <sup>3</sup> /g)
Ni/TiO <sub>2</sub> -SO <sub>4</sub>	62,43	0,232
Ni/TiO <sub>2</sub> -SO <sub>4</sub> setelah Reduksi	47,36	0,102

Hasil analisis BET menunjukkan bahwa luas permukaan pada katalis TiO<sub>2</sub>-SO<sub>4</sub> sebelum dan setelah reduksi diperoleh berturut-turut 62,43 m<sup>2</sup>/g dan 47,36 m<sup>2</sup>/g. Sedangkan total volume total pori sebelum dan setelah proses reduksi diperoleh berturut-turut 0,232 cm<sup>3</sup>/g dan 0,102 cm<sup>3</sup>/g (Tabel 1). Hal ini menunjukkan bahwa proses reduksi dapat menurunkan luas permukaan dan volume pori total dari katalis tersebut.

Berdasarkan hasil analisa serapan IR yang menunjukkan ikatan antara O-Ti-O pada FTIR (Gambar 3) diperoleh bahwa terdapat kisaran 400-1250 cm<sup>-1</sup> dan juga terdapat serapan IR gugus SO<sub>3</sub>H pada daerah sekitar 1040 cm<sup>-1</sup> yang menunjukkan adanya gugus sulfat pada katalis Ni/TiO<sub>2</sub>-SO<sub>4</sub> yang diuji, namun pada katalis yang telah direduksi mengalami penurunan serapan pada gugus sulfat, hal ini menunjukkan proses reduksi telah menghilangkan sebagian gugus sulfat dalam katalis tersebut.

Dapat dilihat juga bahwa puncak serapan pada daerah sekitar 1630 cm<sup>-1</sup> yang menunjukkan adanya ikatan C=H dan puncak serapan sekitar 2900-3000 cm<sup>-1</sup> ini disebabkan adanya ikatan O-H yang berasal dari absorpsi air dalam molekul tersebut.

Sintesis turunan artemisinin, Reaksi hidrogenasi dan metilasi alkohol terjadi dalam satu reaktor (*one pot system*). Reaksi artemisinin dalam metanol dengan menggunakan katalis Ni/TiO<sub>2</sub>-SO<sub>4</sub> dilakukan pada suhu konstan 100°C selama 5 jam yang dialiri gas H<sub>2</sub> pada tekanan konstan 5 bar dalam satu reaktor. Artemisinin terhidrogenasi dengan adanya logam Ni pada katalis Ni/TiO<sub>2</sub>-SO<sub>4</sub> yang bersifat reduktif pada permukaan katalis padat tersebut. Gas hidrogen yang dialirkan secara kontinu selama reaksi pada katalis akan pecah ikatan antar atom hidrogen menjadi bentuk radikal (H•) dan sangat reaktif. Secara bersamaan gugus karbonil yang dimiliki artemisinin akan bereaksi dengan atom H yang teraktivasi pada permukaan katalis padat, sehingga ikatan rangkap dua terputus pada gugus karbonil menjadi satu ikatan dan ikatan yang lainnya digantikan dengan atom H dan terbentuklah senyawa baru yang memiliki gugus -OH yakni dihidroartemisinin.

Larutan penyangga TiO<sub>2</sub>-SO<sub>4</sub> bersifat asam dan berfungsi dalam metilasi alkohol yakni dari gugus hidroksil (OH) menjadi metoksi (-OCH<sub>3</sub>). Dengan adanya penyangga asam pada reaksi sintesis, mula-mula artemisinin bereaksi menjadi dihidroartemisinin melalui proses hidrogenasi kemudian berlanjut dari dihidroartemisinin menjadi artemeter. Metilasi alkohol terjadi karena adanya pengaruh penyangga TiO<sub>2</sub> dan promotor SO<sub>4</sub> yang menambah keasaman katalis padat tersebut, sehingga reaksi hidrogenasi dan metilasi alkohol dapat terjadi bersamaan dalam satu

wadah sehingga dapat disebut *one pot reaction system*.

Hasil sintesis turunan artemisinin yang diperoleh berupa larutan bening kekuningan yang setelah diuapkan menghasilkan padatan berminyak berwarna putih kekuningan seberat 97,30 mg. Untuk mengetahui proses reaksi yang terbentuk maka dilakukan uji pendahuluan yakni uji secara kualitatif dengan menggunakan KLT dengan pelarut toluen-etil asetat-asam format (7:3:1) dan disemprot dengan larutan anisaldehyd untuk identifikasi bercak yang terbentuk. KLT menunjukkan ada 7 bercak. Hasil sintesis turunan artemisinin (HSA) yang terbentuk dibandingkan dengan standar artemisinin (A) dengan Rf 0,84 dan dihidroartemisinin (DHA) dengan Rf 0,47. Dalam kondisi reaksi yang digunakan masih terdapat sisa artemisinin dan DHA dari hasil hidrogenasi artemisinin. Hal ini menunjukkan bahwa reaksi artemisinin menjadi intermediet DHA tidak berjalan secara optimal dan pembentukan artemeter dari intermediet DHA juga belum sempurna. Namun artemeter telah terjadi karena terdapat bercak pada Rf 0,95 yang menunjukkan terbentuknya senyawa yang lebih non polar dibanding artemisinin, sehingga dibutuhkan pemurnian lebih lanjut untuk memisahkan hasil sintesis turunan artemisinin.

**Pemurnian dengan kromatografi kolom.** Pemurnian hasil sintesis menggunakan kromatografi kolom dengan fase diam 300 mg silika gel (E. Merek 7733) dalam kolom kromatografi yang berdiameter 1 cm dengan panjang 30 cm. Fase gerak pertama kali yang digunakan adalah heksana, yang merupakan fase gerak non polar, berguna untuk mengelusi senyawa-senyawa yang bersifat non polar, sehingga eluen yang pertama kali keluar dari kolom merupakan senyawa-senyawa yang relatif non polar. Setelah itu, hasil elusinya diidentifikasi dengan KLT dalam larutan pengembang 4% heksana dalam etil asetat dengan pewarnaan anisaldehyd. Kemudian pemisahan dilanjutkan dengan menaikkan tingkat kepolaran fase gerak yakni dengan penambahan porsi etil asetat. Fase gerak yang digunakan berikutnya adalah heksana-1% etil asetat, heksana-2% etil asetat, heksana-5% etil asetat, heksana-10% etil asetat dan heksana-15% etil asetat. Hasil elusi pada fraksi-fraksi ini diidentifikasi dengan KLT dalam larutan pengembang toluen-etil asetat-asam format (7:3:1). Berdasarkan hasil di atas diperoleh bercak senyawa yang relatif bersifat non polar dibanding kan artemisinin dengan Rf 0,95 yang mungkin adanya senyawa target yaitu artemeter, namun setelah diuji KLT dengan pengembang heksana-4% etil asetat pada bercak tersebut ternyata masih terdapat beberapa senyawa didalamnya, sehingga identifikasi senyawa pada fase gerak heksana atau senyawa yang relatif non polar dibanding

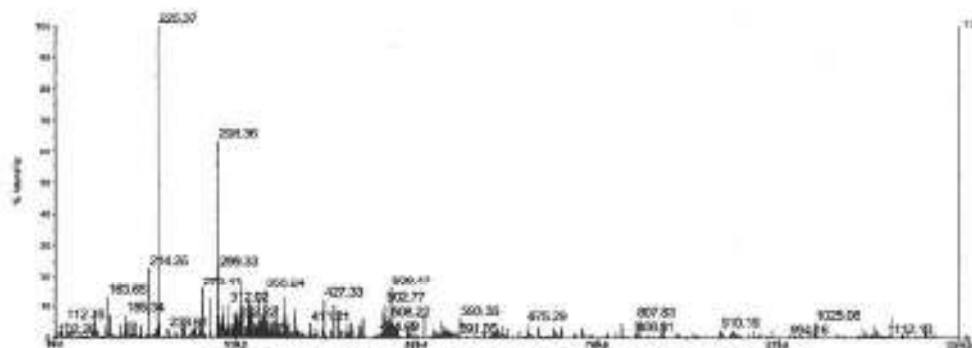
artemisinin telah teridentifikasi dengan larutan pengembang heksana-4% etil asetat. Berdasarkan hasil KLT diperoleh tiga bercak masing-masing FH1, FH2, FH3 yang berturut urut dengan Rf 0,20, 0,44 dan 0,85. Setiap fraksi dikumpulkan berdasarkan senyawa masing-masing, kemudian hasil pemurnian tersebut dianalisa dengan HNMR, IR dan LCMS. Kromatogram yang menunjukkan adanya senyawa artemeter diperoleh dari FH1 pada Rf 0,20. Senyawa target yang diperoleh berwarna putih seberat 1,25 mg (1,29%). Namun pada penelitian ini masih terdapat bahan awal yakni artemisinin dengan berat 23,4 mg (24%) dan juga diperoleh produk dihidroartemisinin sebesar 18,3 mg (19%).

**Identifikasi artemeter.** Analisis artemeter dengan kromatografi cair yang ditandem dengan MS memberikan satu puncak dengan waktu retensi (tR) 1,75 menit. Setelah pemisahan dengan kromatografi cair, *Electrospray ionization mass spectrometry* (ESI-MS) dilakukan untuk menentukan ion-ion dan fragmen pada molekul. Analisis pada ESI-MS ini dengan mode ion positif yang ditandai dengan adanya pembentukan ion molekul dengan penambahan ion-ion seperti  $[M+Na]^+$ ,  $[M+H]^+$ ,  $[M+K]^+$ ,  $[2M+Na]^+$ ,  $[2M+K]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$  dan ion-ion positif lainnya<sup>(15)</sup>. Hasil LC-MS menunjukkan senyawa yang mempunyai rumus molekul  $C_{16}H_{26}O_5$  dan berat molekul 298 g/mol dengan menunjukkan ion molekul pada 299.33  $[M+1]^+$  (Gambar 4).

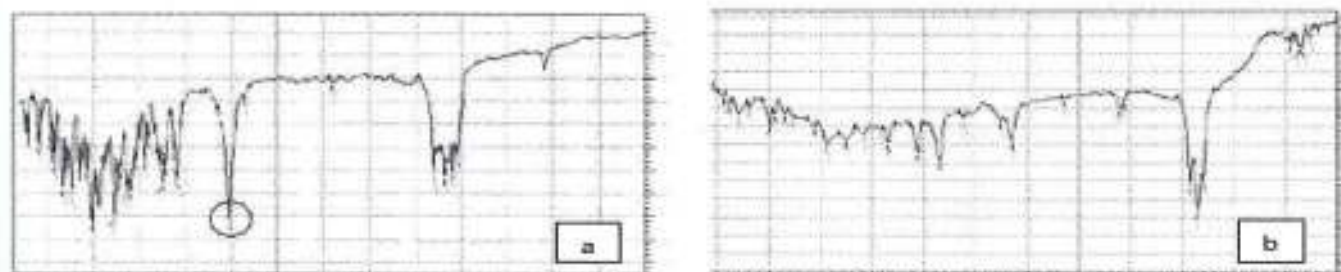
**Analisis spektroskopi infra merah (FT-IR).** Analisis dengan FT-IR menunjukkan bahwa Spektrum IR antara artemisinin dan senyawa target artemeter memiliki persamaan sinyal-sinyal yang spesifik, namun pada senyawa target tidak tampak adanya spektrum pada bilangan gelombang 1735,93  $cm^{-1}$  dengan intensitas tajam dan kuat. Serapan yang menunjukkan adanya vibrasi ulur C=O dari siklik keton dan siklik ester (laktone) sebagaimana tampak pada senyawa artemisinin, ternyata pada spektrum IR artemeter tidak ada serapan pada daerah dengan frekuensi tersebut (Gambar 5 dan Tabel 2).

**Analisis pergeseran kimia (d, ppm) dari spektrum NMR.**  $^{13}C$ -NMR digunakan untuk mengetahui jumlah atom karbon dan menentukan jenis atom karbon pada senyawa tersebut. Spektrum resonansi magnetik inti karbon senyawa target mengandung 16 atom karbon, yang terdiri dari 4 gugus metil ( $CH_3$ ), 4 gugus metilen ( $CH_2$ ), 6 gugus metin ( $CH$ ), dan 2 atom C *quartener* (Gambar 6 dan Tabel 3).

Berdasarkan hasil analisa dengan menggunakan  $^{13}C$ -NMR, pada senyawa target memberikan pergeseran kimia pada 56,16 ppm yang menunjukkan adanya ikatan -O-R yang tidak ditemui dari material dasarnya artemisinin (Gambar 6). Dengan diperkuat hasil



Gambar 4. Spektrum LC-MS fraksi heksana (FH1).



Gambar 5. Hasil pengukuran Spektrum FTIR artemisinin (a) dan artemeter (b).

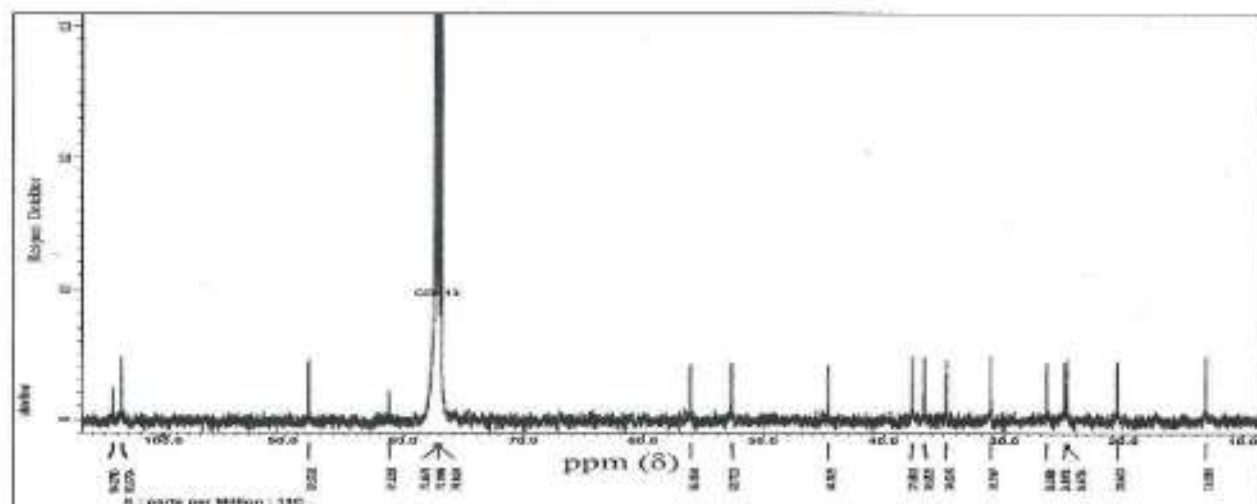
Tabel 2. Perbandingan bilangan gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ ) antara artemeter dan artemisinin dengan data literatur.

No	Literatur ( $\text{cm}^{-1}$ )	Gugus Fungsi	Intensitas	Spektrum IR Artemisinin	Spektrum IR Artemeter
1	2900	Vibrasi ulur C-H Alifatik	Tajam dan Kuat	2846,93-2980,02	2850,79-2954,95
2	1715 – 1780	Vibrasi ulur C-O Siklik Keton dan Ester	Tajam dan Kuat	1735,93	
3	1450-1465	Vibrasi Tekuk $-\text{CH}_2$	Tajam dan Lemah	1454,33	1462,04
4	1375	Vibrasi Tekuk $-\text{CH}_3$	Tajam dan Lemah	1382,96	1377,17
5	1000 – 1300	Vibrasi ulur C-O-C	Tajam dan Lemah	1116,78-1294,24	1022,27-1261,45
6	1085-1150	Vibrasi ulur C-O-O-C	Tajam dan Lemah	1116,78, 881,47 dan 833,28	1101,35; 823,60; 860,25 dan 889,18
7	1200 – 800	Vibrasi ulur C-C Siklik	Tajam dan Lemah	995,27 dan 1027,00	802,39-1165,00

analisa dengan menggunakan  $^1\text{H-NMR}$  menunjukkan adanya sinyal *singlet* pada daerah 3,424 ppm yang spesifik adanya gugus metil yang terisolasi dan juga terikat dengan atom oksigen yakni gugus metoksi ( $-\text{O}-\text{CH}_3$ ) (Gambar 7). Hal ini menunjukkan adanya perubahan dari gugus karbonil menjadi gugus metoksi.

Artemeter memiliki 4 gugus metil, yang berasal dari 3 substituen ( $-\text{CH}_3$ ) dan  $\text{CH}_3$  dari metoksi ( $-\text{O}-\text{CH}_3$ ). Pada atom C nomor 3, 6, dan 9 masing-masing terikat gugus metil sehingga diberi tanda 3Me, 6Me dan 9Me. Dari ketiga metil tersebut, metil yang terikat pada atom C3 ini memberikan pergeseran kimia yang paling *downfield* karena berikatan dengan atom C yang

terikat pada atom oksigen dari gugus endoperoksida pada artemisinin, sehingga kerapatan elektronnya lebih besar dibanding 6Me dan 9Me dan memberikan pergeseran yang lebih *downfield*. Puncak yang dihasilkan oleh 3Me berupa *singlet* karena 3Me tidak memiliki H atom tetangga karena bertetangga dengan atom C kuartener. Sedangkan pada 6Me dan 9Me memiliki 1 atom H tetangga sehingga memberikan sinyal dublet, metil pada metoksi ( $-\text{O}-\text{CH}_3$ ) selain terisolasi yang akan menyebabkan sinyal *singlet* dan juga metil ini terikat dengan atom oksigen secara langsung sehingga memberikan pergeseran kimia yang paling besar dari gugus metil lainnya yakni 3,424 ppm.

Gambar 6. Hasil Pengukuran  $^{13}\text{C}$ -NMR Artemeter.

Tabel 3. Perbandingan pergeseran kimia (ppm) antara artemeter dan artemisinin.

Gugus	Simbol	Senyawa Artemeter			Senyawa Artemisinin		
		$^{13}\text{C}$ -NMR	Pergeseran	$^1\text{H}$ -NMR Peak	$^{13}\text{C}$ -NMR	Pergeseran	$^1\text{H}$ -NMR Peak
Metil ( $\text{CH}_3$ )	9Me	13,16	0,90	D	12,67	0,96	D
	6Me	20,55	0,95	D	19,94	0,96	D
	3Me	26,40	1,44	S	25,29	1,43	S
	O- $\text{CH}_3$	56,16	3,42	S	-	-	-
Metilen ( $\text{CH}_2$ )	5	24,67	1,51	M	24,93	2,09; 1,44	M
	8	24,89	1,64	M	23,49	1,78; 1,19	M
	7	34,83	1,64	M	33,67	1,77; 1,00	M
Metin ( $\text{CH}$ )	4	36,63	1,61	DD	35,97	2,04; 2,07	dd
	9	31,11	2,05	Q	32,98	3,39	Q
	6	37,60	1,75	M	37,61	1,40	M
	8a	44,69	1,54	M	45,03	1,76	M
	5a	52,77	1,51	M	50,11	1,39	M
<i>C</i> quartener	12	103,57	5,38	S	93,81	5,86	S
	10	104,28	4,69	D	172,24	-	-
	12a	87,97	-	-	77,39	-	-
	3	81,32	-	-	105,49	-	-

Gugus metin dan metilen memberikan pergeseran kimia pada daerah 1,5-1,8 ppm dengan saling bertumpang tindih, karena memiliki kerapatan elektron yang mirip satu sama lainnya. Dengan bantuan perangkat lunak Chemdraw dapat diperkirakan senyawa satu dengan lainnya dengan dilihat pergeseran kimianya dari senyawa target. Gugus metin pada atom C10 dan C12 mengalami pergeseran kimia yang cukup besar, terutama pada C10, karena adanya perubahan dari gugus karbonil ( $\text{O}-\text{C}-$ ) menjadi hidroksil ( $-\text{C}-\text{O}-\text{H}$ ) membuat kerapatan elektron pada C10 menjadi melemah sehingga bergeser ke arah medan yang lebih rendah (*upfield*) (Tabel 3).

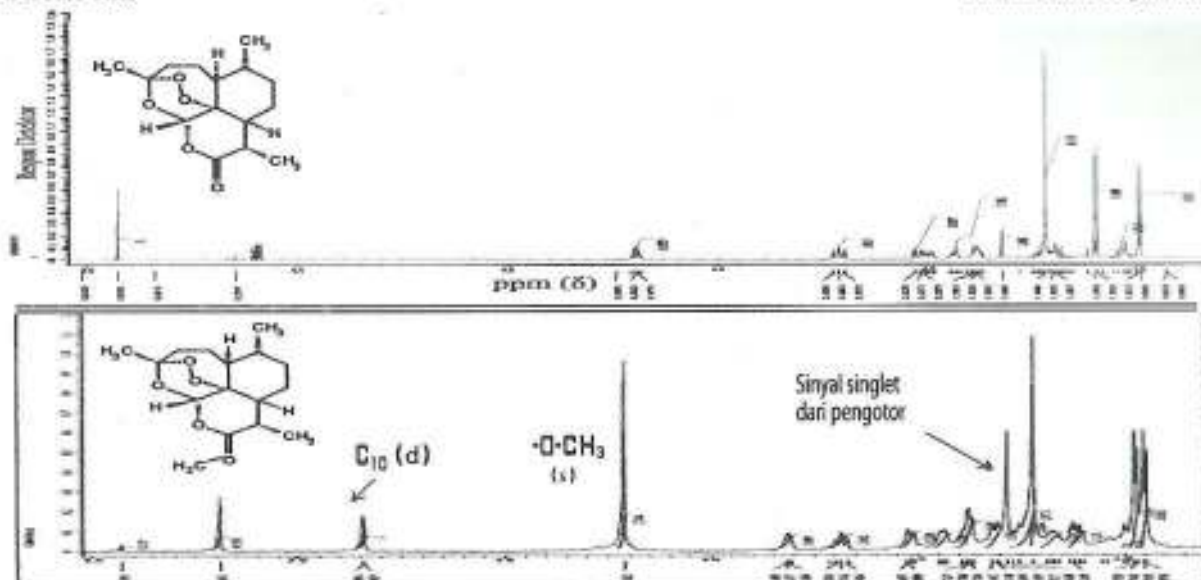
Berdasarkan hasil identifikasi dengan FT-IR, LC-MS, HNMR dan CNMR diperoleh senyawa turunan

artemisinin, yaitu artemeter yang bersifat relatif nonpolar dibanding artemisinin dengan terbentuknya gugus metoksi ( $-\text{OCH}_3$ ) dengan BM 298 g/mol.

**Uji BSLT (Brine Shrimp Lethality Test).** Uji toksisitas pada artemeter dengan metode BSLT memberikan hasil pada Tabel 4. Berdasarkan hasil ini diperoleh persamaan regresi linear,  $y = 55,90x - 70,49$ , sehingga diperoleh nilai  $\text{LC}_{50}$  142,89 ppm (Tabel 4).

Suatu zat dikatakan aktif atau toksik bila nilai  $\text{LC}_{50} < 1000$  ppm untuk ekstrak dan  $\text{LC}_{50} < 30$  ppm untuk senyawa, dengan demikian senyawa uji bersifat cukup toksik karena memiliki  $\text{LC}_{50}$  dibawah 1000 ppm<sup>(13)</sup>.

**Uji aktivitas sitotoksik terhadap sel leukemia L1210.** Salah satu cara uji pendahuluan dalam penentuan senyawa yang berkhasiat sebagai anti

Gambar 7. Hasil Pengukuran <sup>1</sup>H-NMR Artemisinin (atas) dan Artemeter (bawah).

Tabel 4. Hasil uji BSLT artemeter.

Konsentrasi (ppm)	Log K (X)	Akumulasi		Mortalitas (%) (Y)	LC <sub>50</sub>
		Hidup	Mati		
Blanko		0	90	0	142,89
		0	60	0	
		0	30	0	
10	1,00	1	95	1,04	
50	1,70	6	66	8,33	
100	2,00	14	41	25,45	
200	2,30	31	19	62,00	
500	2,70	55	6	90,16	
1000	3,00	85	0	100,00	

Tabel 5. Hasil uji anti kanker terhadap sel leukemia L1210.

Konsentrasi (ppm)	Log Dosis	Jumlah sel hidup rata-rata x10 <sup>4</sup>	% Inhibisi	Probit	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
0	-	23,50	-	-	
1	0,000	15,75	32,98	4,56	
2	0,301	13,50	42,55	4,82	
4	0,602	11,50	51,06	5,03	3,07
8	0,903	8,00	65,96	5,41	
16	1,204	5,50	76,60	5,74	

kanker adalah uji daya hambat terhadap pertumbuhan sel leukemia L1210. Sel leukemia L1210 yang digunakan dalam uji aktivitas anti kanker ini adalah satu galur (*strain*) sel leukemia tikus yang secara rutin telah digunakan untuk uji senyawa anti kanker, baik *in vitro* maupun *in vivo* menggunakan tikus percobaan<sup>(14)</sup>.

Ekstrak kasar dari suatu bahan alam dapat diuji secara langsung dalam biakan sel leukemia L1210.

Jika hasilnya positif menghambat pertumbuhan sel leukemia L1210, maka dapat dikatakan ekstrak tersebut aktif sitotoksik. Ekstrak atau fraksi dinyatakan aktif bila IC<sub>50</sub> ≤ 30 µg/mL. Aktivitas kristal (isolat) dikatakan aktif sebagai anti kanker bila nilai IC<sub>50</sub> ≤ 4 µg/mL<sup>(14)</sup>.

Berdasarkan hasil uji diperoleh IC<sub>50</sub> sebesar 3,07 µg/mL dengan r = 0,9945% dari persamaan regresi y =



0,98x +4,52, sehingga menunjukkan bahwa senyawa target memiliki aktivitas kuat anti kanker (Tabel 5).

### SIMPULAN

Artemeter telah dapat disintesis dengan rendemen sebesar 1,29% (disamping produk intermediat dihidroartemisinin sebesar 19%) dari artemisinin dalam metanol dan katalis Ni/TiO<sub>2</sub>-SO<sub>4</sub> dalam satu wadah reaksi (*one pot system reaction*), melalui tahap hidrogenasi dan alkilasi alkohol.

Uji BSLT pada artemeter memberikan nilai LC<sub>50</sub> sebesar 142,89 ppm, dan uji terhadap sel leukemia L1210 memberikan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 3,07 µg/mL, sehingga artemeter dinilai berpotensi sebagai senyawa sitotoksik.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Syarif A. Farmakologi dan Terapi. Jakarta: Universitas Indonesia Press; 2007. 732.
2. Tang W and Eisenbrand. Chinese drug of plant origin: Chemistry pharmacology and use in traditional and modern medicine: *Artemisia annua*. Springer-Verlag; 1992. 159-71.
3. Purwantiningsih. Artemisinin dari *Artemisia saccharum*, Ledep dan Turunannya Sebagai Komponen Bioaktif Antimalaria. FMIPA Kimia IPB. [karya utama doktor kimia]. 2003.
4. Lai H and Singh NP. Selective cancer cell cytotoxicity from exposure to dihydroartemisinin and holotransferrin. *Cancer Letter*. 1995. 91:41-6.
5. Klayman DL, Lin AJ, Acton N, et al. Isolation of artemisinin (Qinghaosu) from *Artemisia annua* growing in the United States. *J Natural Products*. 1984. 47(4):715-7.
6. Klayman DL. Qinghaosu (Artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science Direct*. 1985. 228:1054-94.
7. Li Y, Yuan-Ming Zhu, Hong-Jian Jiang, Jian-Ping Pan, Guang-Shao Wu, and Jin-Ming Wu. Studies on artemisinin analogs. I. synthesis of ether, Carboxylates and carbonates of dihydroartemisinin. *Acta Pharm Sin*. 1981. 16:429-39.
8. Lin AJ, Klayman DL, Milhous WK. (1987). Antimalarial activity of new water soluble dihydroartemisinin derivatives. *J Med Chem*. 1987. 30:2147-50.
9. Lin AJ, Lee M, Klayman DL. Antimalarial Activity of New Water Soluble Dihydroartemisinin Derivatives and stereospecificity of the ether side chain. *J Med Chem*. 1989. 32:1249-52.
10. Jenie SA. Sintesa nanomaterial katalis super asam untuk sistem satu-reaktor (*One Pot System*) siklisasi dan hidrogenasi. Laporan Penelitian LIPI-Serpong. 2009.
11. Laksono AJ. Sintesa Nano Material Katalis Super Asam untuk Sistem Satu-Reaktor (*One Pot System*) Siklisasi dan Hidrogenasi. Laporan Penelitian LIPI-Serpong. 2008.
12. Lin AJ. Antimalarial activity of new dihydro-artemisinin derivatives. 6.  $\alpha$ -alkylbenzylic-ethers. *J Med Chem*. 1995. 38:764-70.
13. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*. 1982. 45:31-4.
14. Sumatra M. Bioassai *in vitro* dengan sel leukemia L1210, sebuah metode skrining zat anti tumor dari bahan alam. Prosiding Seminar Bioteknologi Kelautan Indonesia. Jakarta. 1998. 183-4.
15. Wang, et al. Analysis of artemisinin in *Artemisia annua* L. by LC-MS with selected ion monitoring. *J Agric Food Chem*. 2005. 53: 7010-3.