PS1
48
Jakarta

LAPORAN PENELITIAN

STUDI DERIVAT CATECHIN SEBAGAI BAHAN BAKU ANTIVIRUS HIV TAHAP I: DERIVATISASI ISOLAT CATECHIN DARI *UNCARIA GAMBIR* ROXB.

Lina Rustanti, M.Mol.Biol.,Apt

PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA
2012

LAPORAN PENELITIAN

STUDI DERIVAT CATECHIN SEBAGAI BAHAN BAKU ANTIVIRUS HIV TAHAP I: DERIVATISASI ISOLAT CATECHIN DARI *UNCARIA GAMBIR* ROXB.

Lina Rustanti, M.Mol.Biol.,Apt

PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA
2012

Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
PERPUSTAKAAN
Tanggal : 18-6-2013
No. Induk :
No. Klass : PS1
48

SUSUNAN TIM PENELITI

Susunan tim berdasarkan Keputusan Kepala Pusat biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan No.HK.03.05/III/750/2012:

Ketua Pelaksana Penelitian	: Lina Rustanti,MMol,Biol, Apt
Peneliti	: Dra. Ani Isnawati, M.Kes, Apt
	: Dra. Daroham Mutiatikum,Msi,Apt
	: Dra. Mariana Raini,M.Kes,Apt
	: Dr. Vivi Lisdawati,Msi,Apt
	: Dra. Sukmayati Alegantina
	: Indri Rooslamiati, S.Si, MSc, Apt
	: Yulia Anita, MSc
	: Nyoman Fitri, MS, Apt
	: Dra. Pudji Lastari, Apt
	: Herni Asih Setyorini, S.Si, Apt
	: Novi Sulistyaningrum, MSi
	: Rosa adelina, S.Si, Apt
	: Arifayu Adiena Kurniatri, S.Si
	: Nurul Aini, S.Si, Apt
	: Ratih Dian Saraswati, S.Si
Pembantu Peneliti	: Lia Meliawati, Amd
	: Intan Sari Oktoberia
	: Indah Sulistyowati
Sekretariat Penelitian	: Kelik Muhammad Arifin, S.Sos

KEMENTERIAN KESEHATAN RI
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745
Fax (021) 42881754

KEPUTUSAN
KEPALA PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN
NOMOR: HK.03.05/III/750/2012

T E N T A N G

PEMBENTUKAN TIM PELAKSANA PENELITIAN TAHUN 2012

KEPALA PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

MENIMBANG : a. bahwa untuk melaksanakan kegiatan penelitian pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, perlu ditunjuk Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2012;

b. bahwa berdasarkan pertimbangan huruf a tersebut diatas, maka dipandang perlu menetapkan Keputusan Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan tentang Pembentukan Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2012 sejumlah tujuh belas penelitian;

MENGINGAT : 1. Undang-Undang Nomor 23 Tahun 1992 tentang Kesehatan (Lembaran Negara Republik Indonesia tahun 1992 Nomor 100, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 3495);

2. Undang-undang Nomor 14 Tahun 2001 tentang Paten (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2002 Nomor 109, Tambahan Lembaran negara Republik Indonesia Nomor 4130);

3. Peraturan Pemerintah RI No. 39 Tahun 1995 tentang Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (Lembaran Negara Tahun 1995 Nomor 67, Tambahan Lembaran Negara Nomor 3609);

4. Peraturan Pemerintah Nomor 20 Tahun 2005 tentang Alih Tehnologi Kekayaan Intelektual serta hasil Penelitian dan Pengembangan oleh Perguruan Tinggi dan Lembaga Penelitian dan Pengembangan (Lembaran Negara Tahun 2005 Nomor 43, Tambahan Lembaran Negara Nomor 4497);

5. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 791/Menkes/SK/VII/1999 tentang Koordinasi Penyelenggaraan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;

6. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 1179A/Menkes/SK/X/1999 tentang Kebijakan Nasional Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;

Peraturan Presiden Nomor 47 Tahun 2009 tentang Pembentukan dan Organisasi Kementerian Negara.

7. Peraturan Menteri Kesehatan No. 1144/Menkes/Per/VIII/2010 tentang Organisasi dan Tata Kerja Kementerian Kesehatan;

8. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No.HK.03.05/4/11675/ 2011 tanggal 30 Desember 2011 tentang Penetapan Kuasa Pengguna Anggaran, Pejabat Pembuat Komitmen, Pejabat Penguji dan Penandatanganan SPM, Bendahara Pengeluaran dan Bendahara Penerimaan pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan di Jakarta tahun anggaran 2012;

MEMPERHATIKAN : 1. Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran (DIPA) Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan tahun 2012 dengan No.0683/024-11.1.01/00/2012, tanggal 9 Desember 2011;

KEMENTERIAN KESEHATAN RI
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

Jl. Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745
Fax (021) 42881754

M E M U T U S K A N

MENETAPKAN :

KESATU : 1) Membentuk Tim Pelaksana Penelitian Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Tahun 2012 sebagaimana tercantum dalam lampiran keputusan ini;

2) Kepada Tim Pelaksana Penelitian pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbang Kesehatan Tahun Anggaran 2012, dapat diberikan honorarium sebagaimana tersebut dalam lampiran 2 Keputusan ini;

KEDUA : Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2012 mempunyai tugas sebagai berikut:

1) Melaksanakan Penelitian pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Tahun 2012, dengan susunan Tim seperti pada lampiran surat keputusan ini;

2) Menyerahkan Laporan Kemajuan Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian dan Laporan Akhir Penelitian kepada Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan.

KETIGA : Dalam melaksanakan tugasnya, Tim bertanggungjawab kepada Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan serta wajib menyampaikan laporan akhir penelitian sebagai pertanggungjawaban kegiatan;

KEEMPAT : Biaya pelaksanaan kegiatan serta honor Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2012 dibebankan pada anggaran DIPA Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Tahun 2012;

KELIMA : Keputusan ini mulai berlaku sejak bulan Januari sampai dengan Desember 2012 dengan ketentuan apabila dikemudian hari ternyata terdapat kekeliruan dalam penetapan ini akan diadakan perbaikan dan perubahan sebagaimana mestinya.

Ditetapkan di : Jakarta
Pada tanggal : 6 Februari 2012

Kepala,

Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si., Apt
NIP 19621119 198803 100 1

Tembusan Yth:
1. Sekretaris Jenderal Kemenkes RI;
2. Inspektur Jenderal Kemenkes RI
3. Ketua Badan Pemeriksa Keuangan;
4. Kepala Badan Pengawasan Keuangan dan Pembangunan;
5. Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
6. Sekretaris Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
7. Kanwil Ditjen Anggaran Kemenkeu RI DKI Jakarta;
8. Para Kepala Pusat di Lingkungan Badan Litbang Kesehatan;
9. Kepala Bagian Tata Usaha Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
10. Kepala Bidang Biomedis, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
11. Kepala Bidang Teknologi Dasar Kesehatan, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
12. Bendaharawan Pengeluaran Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
13. Masing-masing yang bersangkutan untuk dilaksanakan.

KEMENTERIAN KESEHATAN RI
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745
Fax. (021) 42881754

Lampiran 1
Keputusan Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan
Nomor : HK.03.05/III/750/2012
Tanggal : 6 Februari 2012

SUSUNAN TIM PELAKSANA PENELITIAN TAHUN 2012

STUDI DERIVAT CATECHIN SEBAGAI BAHAN BAKU ANTI VIRUS HIV TAHAP I : DERIVATISASI ISOLAT CATECHIN *UNCARIA GAMBIR* ROXB

1.	**Lina Rustanti, M.Mol.Biol, Apt**	:	**Peneliti Pertama/Ketua Pelaksana**
2.	Dra. Ani Isnawati, M.Kes, Apt	:	Peneliti Madya
3.	Dra. Daroham Mutiatikum, M.Si, Apt	:	Peneliti Madya
4.	Dra. Mariana Raini, Apt. M.Kes	:	Peneliti Madya
5.	Dr. Vivi Lisdawati, M.Si, Apt	:	Peneliti Muda
6.	Dra. Sukmayati Alegantina	:	Peneliti Muda
7.	Indri Rooslamiati, M.Sc, Apt	:	Peneliti Pertama
8.	Nyoman Fitri, M.Sc	:	Peneliti Pertama
9.	Yulia Anita, M.Sc	:	Peneliti Pertama
10.	Dra. Pudji Lastari, Apt	:	Peneliti Pertama
11.	Herni Asih Setyorini, S.Si, Apt	:	Peneliti Pertama
12.	Novi Sulistyaningrum, M.Si	:	Peneliti Non Fungsional
13.	Rosa Adelina, S,Si, Apt	:	Peneliti Non Fungsional
14.	Arifayu Addiena Kurniatri, S.Si	:	Peneliti Non Fungsional
15.	Nurul Aini, S.Si, Apt	:	Peneliti Non Fungsional
16.	Ratih Dian Saraswati, S.Si	:	Peneliti Non Fungsional
17.	Lia Meilawati, Amd	:	Pembantu Peneliti
18.	Intan Sari Oktoberia	:	Pembantu Peneliti
19.	Indah Sulistyowati	:	Pembantu Peneliti
20.	Kelik Muhammad Arifin, S.Sos	:	Sekretariat Penelitian

Kepala

Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si, Apt
NIP. 196[illegible] 198803 1001

KEMENTERIAN KESEHATAN RI
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745
Fax (021) 42881754

Lampiran 2
Keputusan Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan
Nomor : HK.03.05/III/750/2012
Tanggal : 6 Februari 2012

JUDUL PENELITIAN : STUDI DERIVED CATECHIN SEBAGAI BAHAN BAKU ANTI VIRUS HIV TAHAP I: DERIVATISASI ISOLAT CATECHIN *UNCARIA GAMBIR* ROXB

JUMLAH HONOR TIM PELAKSANA PENELITIAN TAHUN 2012

1.	Peneliti Madya	: Jumlah honor yang diterima per-jam, per-minggu sebesar	=Rp	50.000
2.	Peneliti Muda	: Jumlah honor yang diterima per-jam, per-minggu sebesar	=Rp	40.000
3.	Peneliti Non Fungsional	: Jumlah honor yang diterima per-jam, per-minggu sebesar	=Rp	30.000
4.	Peneliti Pertama	: Jumlah honor yang diterima per-Jam sebesar	=Rp	35.000
5.	Sekretariat Penelitian	: Jumlah honor yang diterima per-bulan sebesar	=Rp	300.000
6.	Pembantu Peneliti	: Jumlah honor yang diterima per-jam, per-minggu sebesar	=Rp	20.000

Kepala,

Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si., Apt
NIP 19621119 198803 100 1

KATA PENGANTAR

Laporan yang berjudul "Studi Derivat Chatechin Sebagai Bahan Baku Antivirus HIV Tahap I : Derivatisasi Isolat Catechin dari *uncaria gambir* roxb." ini merupakan pengembangan obat baru anti virus HIV/AIDS dari senyawa bahan alam. Penelitian ini merupakan studi pendahuluan dalam pengadaan bahan baku obat untuk mengatasi HIV/AIDS. Indonesia mempunyai kekayaan hayati yang besar terutama tanaman obat yang secara turun temurun telah digunakan sebagai obat tradisional. Banyak tanaman obat yang secara empirik telah digunakan masyarakat sebagai terapi imun dan terapi adjuvant pada infeksi HIV/AIDS. Oleh karena itu dalam rangka kemandirian bahan baku obat maka dilakukan upaya penelitian derivatisasi chatechin ini.

Penelitian ini dikerjakan bersama melalui kerjasama antar institusi LIPI dan Pusat Biomedis dan Teknologi dasar Kesehatan. Pemeriksaan bersama sangat membutuhkan kerjasama antara institusi, baik mengenai tukar informasi mengenai metode pemeriksaan, cara isolasi dan derivatisasi, sampai pada penyampaian hasil. Bersama ini kami sampaikan bahwa keberhasilan ini tidak terlepas dari kerja keras peneliti dan litkayasa dalam menyelesaikan kerja bersama.

Akhir kata semoga Laporan ini dapat dimanfaatkan dan dapat berguna bagi kesehatan masyarakat.

Jakarta, Desember 2012

Penulis

RINGKASAN EKSEKUTIF

Judul: Derivat Catechin sebagai Bahan Baku Antivirus HIV. TAHAP I: Derivatisasi Isolat Catechin dari *Uncaria gambir* ROXB.

Nama penyusun: Lina Rustanti, M.Mol. Biol., Apt.

Latar belakang: Kasus HIV/AIDS di Indonesia masih cukup tinggi. Akan tetapi, obat-obat antiretroviral (ARV) yang ada saat ini memiliki banyak keterbatasan. Indonesia memiliki potensi sumber daya hayati yang besar dalam etnofarmakologi. Salah satunya adalah ekstrak gambir yang selama ini merupakan komoditi ekspor besar sebagai bahan penyamak. Ekstrak gambir ini memiliki kandungan catechin yang tinggi. Derivat *catechin*, antara lain *epigallocatechin gallate (EGCG)* dan *epicatechin gallate (ECG)*, telah terbukti secara molekuler memiliki potensi inhibitor enzim *integrase* sehingga menghambat penempelan virus HIV pada sel CD4, selain juga menghambat enzim *polymerase* dan *reverse transcriptase (RT)*.

EGCG dan *ECG* yang selama ini beredar di pasaran berasal dari ekstrak teh hijau. Harganya mahal karena perlu jumlah simplisia yang besar untuk mendapatkan isolatnya. Oleh karena itu, penelitian ini menderivatisasi isolat *catechin* gambir menjadi *EGCG* dan *ECG* sebagai kandidat antivirus HIV.

Tujuan: Penelitian ini merupakan studi pendahuluan dalam rangka kemandirian bahan baku obat untuk mengatasi HIV/AIDS. Pada penelitian ini dilakukan sintesis senyawa turunan catechin, yaitu EGCG dan ECG, dimana digunakan catechin sebagai senyawa induknya. Adapun tahapan yang akan ditempuh dalam penelitian ini menuju keluaran produk adalah sebagai berikut:

Tahap I (tahun 2012) : Derivatisasi *EGCG* dan *ECG* dari isolat *catechin Uncaria gambir* Roxb.

Tahap II (tahun 2014) : Kultur beberapa *strain* virus HIV yang berasal dari Indonesia dan uji aktivitas farmakologi senyawa *EGCG* dan *ECG* sebagai anti-HIV secara *invitro* (molekuler)

Tahap III (tahun 2015) : Studi interaksi molekuler obat dan reseptor untuk mengetahui mekanisme aksi farmakologi

Tahap IV (tahun 2016) : Studi formulasi senyawa hasil derivatisasi sebagai sediaan antivirus dan studi toksisitas

Hasil utama: Hasil utama dari penelitian ini adalah produk dan metode. Produk derivat catechin yang berhasil didapatkan dalam penelitian ini baru catechin gallate, yang didapatkan dengan cara derivatisasi isolat catechin *Uncaria gambir* Roxb. dengan metode sintesa tak langsung dengan proteksi gugus hidroksil catechin.

Relevansi: Senyawa yang berhasil didapatkan dalam penelitian ini potensial untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai antivirus untuk HIV-1. Ini juga mendukung kemandirian bahan baku obat.

Kesimpulan: Catechin gallate berhasil disintesa melalui derivatisasi isolat catechin dari ekstrak *Uncaria gambir* Roxb. Metode yang paling optimal untuk menghasilkan senyawa catechin gallate dari isolat catechin adalah dengan derivatisasi secara tidak langsung, yaitu melalui tahap proteksi gugus OH pada catechin dan juga proteksi senyawa pereaksinya yaitu methyl gallate. Epimer catechin gallate, yaitu Epicatechin gallate (ECG) masih belum terbentuk karena masib perlu optimasi metode oksidasi-reduksi untuk pembentukan senyawa epimer.

Senyawa target kedua yaitu Epigallocatechin gallate (EGCG) tidak berhasil disintesa dari derivatisasi catechin dikarenakan ketidakselektifan gugus untuk penambahan hidroksil. Pembentukan senyawa EGCG dari catechin sebagai *starting material* memerlukan tahap reaksi yang lebih kompleks yang membutuhkan *cold chain* dan reaksi pada suhu sangat dingin (-80 °C).

Saran: Untuk pengembangan derivat catechin menuju antivirus HIV utamanya ECG yang dihasilkan dalam penelitian ini, perlu dilakukan penelitian lanjut mengenai metode epimerisasi yang paling tepat dengan reagen yang sesuai dan mudah didapat.

Pengembangan senyawa EGCG dari isolat catechin bisa dilakukan tetapi memerlukan peralatan yang tidak sederhana karena perlunya reaksi pada suhu dingin. Sebagai alternatif, bisa dikembangkan penelitian untuk membuat EGCG dengan cara sintesa murni.
Pengembangan senyawa EGCG dari isolat catechin bisa dilakukan tetapi memerlukan peralatan yang tidak sederhana karena perlunya reaksi pada suhu dingin. Sebagai alternatif, bisa dikembangkan penelitian untuk membuat EGCG dengan cara sintesa murni.

ABSTRAK

Latar belakang : Jumlah kasus *Acquired Immunune Deficiency Syndrom* (AIDS) di Indonesia yang dilaporkan sebanyak 24.131 kasus di 33 provinsi. Dari jumlah kasus tersebut, 4.250 kasus atau 18.7% diantaranya meninggal dunia. Sampai saat ini Obat-obat yang ada hanya bertujuan untuk memperlambat perkembangan infeksi HIV menjadi AIDS dan memperpanjang angka harapan hidup pasien dengan AIDS. Indonesia mempunyai kekayaan hayati yang besar terutama tanaman obat yang secara turun temurun telah digunakan sebagai obat tradisional. Banyak tanaman obat yang secara empirik telah digunakan masyarakat sebagai terapi imun dan terapi adjuvant pada infeksi HIV/AIDS. Salah satu tanaman obat yang potensial sebagai antivirus yaitu *Uncaria gambir* Roxb. Tanaman gambir banyak mengandung chatecin dengan derivatisasi akan diharapkan terbentuk senyawa *Epigallocatechin gallate* (ECGC) dan *Epicatechin gallate* (ECG). Senyawa ini yang berperan sebagai antivirus dan diharapkan akan menjadi bahan baku antivirus.

Metode : Tahap pengerjaan meliputi : karakterisasi ekstrak gambir (non spesifik: kadar air, susut pengeringan, kadar abu total dan kadar abu tidak larut asam serta spesifik : penetapan kadar chatecin). Tahap selanjutnya adalah isolasi dan pemurnian chatecin dari ekstrak gambir. Isolat catechin yang diperoleh diderivatisasi dengan menggunakan metode langsung dan tidak langsung. Metode langsung ini merupakan esterifikasi secara langsung chatecin dan asam galat dan metode tak langsung meliputi proteksi, esterifikasi dan deproteksi. Hasil reaksi diidentifikasi dengan menggunakan : Spektrofotometer IR, LCMSMS dan NMR.

Hasil : Karakterisasi non spesifik untuk susut pengeringan 16,04 %, kadar air 11,96 %, kadar abu total 1,01 %, kadar abu tidak larut asam 0,42%. Kadar chatecin 92%. Purifikasi chatecin sebanyak diperoleh 5,235 gram. Metode sintesa tidak langsung optimal untuk derivatisasi catechin, sedangkan metode langsung tidak menghasilkan produk yang *catechin gallate*. *Epicatechin gallate* dan *Epigallocatechin gallate* belum berhasil didapatkan.

Kata kunci : HIV, catechin, ECG, EGCG, derivatisasi, *Uncaria gambir* Roxb.

DAFTAR ISI

SUSUNAN TIM PENELITI i

SURAT KEPUTUSAN PENELITIAN ii

KATA PENGANTAR vi

RINGKASAN EKSEKUTIF vii

ABSTRAK ix

DAFTAR ISI xi

DAFTAR TABEL xii

DAFTAR GAMBAR xiii

DAFTAR LAMPIRAN xiv

I PENDAHULUAN 1

III TUJUAN DAN MANFAAT 6

A. Tujuan 6

B. Manfaat 6

II TINJAUAN PUSTAKA 7

IV PERTANYAAN PENELITIAN 10

V METODE 11

A. Kerangka Pikir Penelitian 11

B. Tempat dan Waktu Penelitian 11

C. Jenis Penelitian 12

D. Desain Penelitian 12

E. Sampel Penelitian 12

F. Data Yang Dikumpulkan 12

G. Bahan dan Prosedur Kerja 12

VI HASIL 18

VII PEMBAHASAN..... 23

VIII KESIMPULAN DAN SARAN..... 28

A. Kesimpulan..... 28

B. Saran..... 28

IX UCAPAN TERIMA KASIH..... 29

X DAFTAR KEPUSTAKAAN..... 30

XI LAMPIRAN..... 32

DAFTAR TABEL

Tabel 1 Gradien solven purifikasi isolat catechin 14

Tabel 2 Gradien solven purifikasi catechin gallate 17

Tabel 3 Hasil karakterisasi ekstrak gambir 18

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1	Ikatan EGCG terhadap gp120 dan CD4 dalam komplek gp120-EGCG-CD4	3
Gambar 2	Interaksi senyawa Epigallocatechin gallate dengan enzim HIV-1 *integrase*	3
Gambar 3	Purifikasi isolat catechin dengan metode KCKV	18
Gambar 4	Hasil KLT proses proteksi catechin	19
Gambar 5	Hasil KLT proses purifikasi catechin terproteksi	19
Gambar 6	Spektra H-NMR 5,7-bis(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl) chroman-3-ol (senyawa hasil proteksi catechin)	20
Gambar 7	Spektra H-NMR 5,7-bis(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl) chroman-3-ol (senyawa hasil proteksi catechin)	20
Gambar 8	Hasil KLT proses proteksi methyl gallate	20
Gambar 9	Hasil KLT proses purifikasi catechin terproteksi	21
Gambar 10	H-NMR methyl 3,4,5-tris (benzyloxy) benzoate	21
Gambar 11	H-NMR methyl 3,4,5-tris (benzyloxy) benzoate	21
Gambar 12	Hasil KLT proses hidrolisis methyl 3,4,5-tris(benzyloxy) benzoate menjadi 3,4,5-tris (benzyloxy) benzoic acid	22
Gambar 13	Hasil KLT proses esterifikasi Tris-benzyl-catechin gallate dengan asam gallate	22
Gambar 14	Reaksi proteksi catechin dengan benzyl chloride	25
Gambar 15	Reaksi hidrolisis tris-benzyl methyl gallate menjadi tris-benzyl gallic acid	27

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Persetujuan Atasan yang Berwenang.....	32
Lampiran 2	Pembebasan Persetujuan Etik (*Exempted*).....	33
Lampiran 3	Hasil uji HPLC catechin.....	34
Lampiran 4	Hasil uji LC/MS-MS catechin.....	35

I. PENDAHULUAN

Menurut data Ditjen Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan (PP &PL) Kementerian Kesehatan RI per Desember 2010, secara kumulatif jumlah kasus *Acquired Immunune Deficiency Syndrom* (AIDS) di Indonesia yang dilaporkan sebanyak 24.131 kasus di 33 provinsi. Angka kejadian AIDS tertinggi dilaporkan dari provinsi Papua, diikuti oleh Bali dan DKI Jakarta. Proporsi kasus tertinggi adalah pada usia produktif sebanyak 49,07%. Dari jumlah kasus tersebut, 4.250 kasus atau 18.7% diantaranya meninggal dunia.[1]

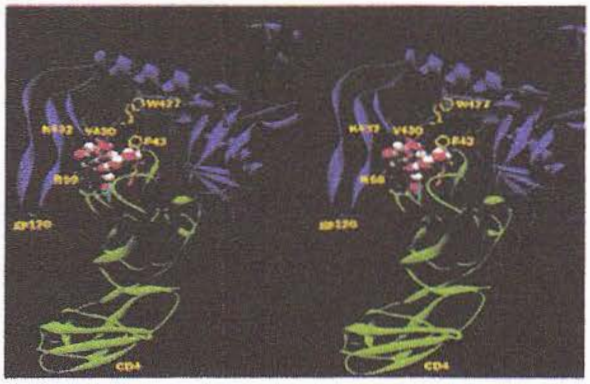
Sampai saat ini, belum ada obat yang sepenuhnya dapat menyembuhkan *Human Immunodeficiency Virus* (HIV)/AIDS. Obat-obat yang ada hanya bertujuan untuk memperlambat perkembangan infeksi HIV menjadi AIDS dan memperpanjang angka harapan hidup pasien dengan AIDS. *Antiretroviral* (ARV) yang sudah ada berfungsi untuk menghambat replikasi virus, salah satunya yaitu dengan mengikat enzim *reverse transcriptase* dan *protease* yang diperlukan dalam replikasi HIV. Harga ARV cukup tinggi dan sebagian ARV yang dipakai di Indonesia merupakan produk impor. Untuk mengoptimalkan akses terhadap obat- obat ARV tersebut diperlukan dana subsidi yang besar. Selain itu, ARV yang selama ini digunakan memiliki banyak keterbatasan, antara lain; munculnya interaksi dengan obat-obatan lain mengingat pasien dengan AIDS sebagian besar mengkonsumsi obat lain selain ARV, jumlah dan jenis obatnya terbatas, banyak efek samping yang ditimbulkan sehingga mengakibatkan rendahnya tingkat kepatuhan pasien serta munculnya resistensi.[2] Resistensi juga dipicu oleh variasi genetik dari virus.[3]

Indonesia mempunyai kekayaan hayati yang besar terutama tanaman obat yang secara turun temurun telah digunakan sebagai obat tradisional. Banyak tanaman obat yang secara empirik telah digunakan masyarakat sebagai terapi imun dan terapi adjuvant pada infeksi HIV/AIDS.[1] Berdasarkan hasil Riskesdas 2010, presentase penduduk umur ≥15 tahun yang memilih pengobatan tradisional adalah sebesar 45,17%.[4]

Salah satu tanaman obat yang potensial sebagai antivirus yaitu *Uncaria gambir* Roxb.

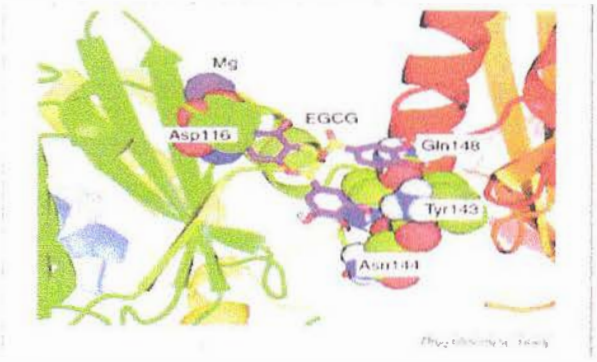
Gambir merupakan tanaman khas dari daerah Sumatera Barat, Sumatera Selatan dan Bengkulu. Ekstrak kering gambir merupakan komoditas unggulan dari daerah tersebut. Hampir 90% pasokan gambir untuk ekspor dihasilkan dari Sumatera Barat.[5] Secara tradisional, gambir telah banyak digunakan sebagai obat diare, disentri, antivirus, luka bakar dan sariawan mulut (obat kumur).[6,7] Kandungan kimia gambir adalah *catechin* (7-33%), asam catechu tanat (20-55%), *pyrocathecol* (20-30%), gambir fluoresen (1-3%), catechu merah (3-5%), quersetin (2-4%), fixed oil (1-2%), lilin (1-2%) dan alkaloid dalam kadar kecil. Selain itu, gambir juga mengandung *catechin* yang mempunyai gugus gallat seperti *gallocatechin* dan *catechin gallate*.[8] Sedangkan kandungan katekin di daun teh hijau berkisar sekitar 10% bobot kering, termasuk ECG dan EGCG. Derivat katekin yang berpotensi sebagai antivirus yaitu *epigallocatechin gallate* (*EGCG*) dan *epicatechin gallate* (ECG).[9]

Molekul CD4 merupakan target pengikatan HIV dalam proses terjadinya infeksi. EGCG telah terbukti secara molekuler mampu menghambat infeksi HIV dengan cara mengikat asam amino Arginin (Arg59) dan Aspargin (Asn39) pada rantai samping CD4+ T-sel yang merupakan sisi aktif untuk berikatan dengan HIV *envelope glycoprotein (gp120)*. Dengan terblokirnya CD4 reseptor, maka gpl20 pada HIV envelope tidak bisa mengikat permukaan sel CD4 untuk fusi. Berdasarkan simulasi molekular docking pada gambar 1, EGCG mengikat domain D1 pada CD4 membentuk EGCG-CD4 complex. Ikatan hidrogen terbentuk antara Arg59 pada CD4 dengan O8 pada gugus karboksil EGCG. Pada saat ada HIV, gugus NH yang berasal dari backbone Glisin (Gly431) pada gpl20 virus membentuk ikatan hidrogen dengan gugus amin Asn39 pada CD4. Ikatan hidrogen ini justru menstabilkan ikatan antara EGCG dengan CD4 membentuk kompleks gpl20-EGCG-CD4. Dengan demikian, *EGCG* berperan sebagai *HIV-1 entry inhibitor*.[9]



Gambar 1. Ikatan EGCG terhadap gp120 dan CD4 dalam komplek gp120-EGCG-CD4.[9]

Penelitian lain menemukan bahwa *EGCG* dan *ECG* merupakan inhibitor enzim *HIV-1 integrase*. Dengan cara tersebut, materi genetik HIV tidak bisa berintegrasi dengan DNA pada sel CD4 T-sel manusia sehingga tidak terekspresikan. Gambar 1 berikut menjelaskan lokasi ikatan EGCG dengan enzim *HIV-1 integrase,* yaitu mengikat asam amino Glutamin (Gln148) dan Tyrosin (Tyr 143).[10]



Gambar 2. Interaksi senyawa Epigallocatechin gallate dengan enzim *HIV-1 integrase*.[10]

Disamping itu, ada pula penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa catechin terasetilasi mampu menginhibisi enzim polymerase sehingga menghambat terbentuknya asam nukleat HIV. *Inhibition concentration* (IC_{50}) *EGCG* dan *ECG* terhadap enzim polymerase berturut-turut adalah 0,73 µM dan 0,76 µM.[3] *EGCG* dan *ECG* juga terbukti poten sebagai inhibitor enzim HIV-1 *Reverse Transcriptase* (RT) dengan IC_{50} sebesar 0,0066 µM dan 0,084 µMberturut-turut terhadap hasil kloning

HIV-1 RT.[11]

Penelitian tersebut diatas menggunakan isolat *EGCG* dan *ECG* yang berasal dari daun teh hijau. *EGCG* merupakan salah satu jenis *catechin*. Ekstrak gambir memiliki kandungan *catechin* yang tinggi yaitu sebesar 80-90%[7], sedangkan pada ekstrak teh hijau kandungan *EGCG* dan *ECG* sekitar 30-40%[9]. Ekstrak gambir telah banyak diteliti baik khasiat maupun toksisitasnya. Penelitian mengenai mutagenitasnya membuktikan bahwa ekstrak gambir tidak bersifat mutagenik. Akan tetapi, belum ada data mengenai kandungan *EGCG* dan *ECG* di dalam gambir maupun data mengenai derivatisasi *EGCG* dan *ECG* dari isolat *catechin* gambir. Oleh karena itu, penelitian ini akan menderivatisasi catechin yang berasal dari ekstrak gambir menjadi *EGCG* dan *ECG*.

Penelitian mengenai *genotyping* virus HIV yang dilakukan oleh Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Balitbangkes telah berhasil mengidentifikasi HIV *strain* dari delapan *site* di Indonesia. Disamping itu, Balitbangkes juga menyimpan isolat virus yang bisa digunakan untuk pengembangan obat antiviral yang spesifik untuk virus yang ada di Indonesia. Penelitian selanjutnya akan memanfaatkan hasil isolat virus tersebut dalam bentuk kultur dan RNA untuk studi farmakologi molekuler jika *EGCG* dan *ECG* sudah berhasil didapatkan. Pada tahap selanjutnya akan juga dilakukan simulasi interaksi struktur obat dan reseptor untuk memperkirakan hubungan antara struktur dan aktivitas farmakologisnya.

Pada penelitian ini dilakukan sintesis senyawa turunan *catechin*, yaitu *EGCG* dan *ECG*, dimana digunakan *catechin* sebagai senyawa induknya. Senyawa turunan *catechin* ini diperoleh melalui tiga jenis reaksi sintesis. Pertama, reaksi proteksi terhadap gugus hidroksi pada cincin A dan B kerangka dasar *catechin* dan juga proteksi pada asam gallat. Jenis reaksi kedua merupakan reaksi esterifikasi gugus hidroksi pada C-3 dengan asam galat. Reaksi ketiga adalah deproteksi menggunakan 10% Pd/C dan gas H_2. Hasil reaksi diidentifikasi dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dan dimurnikan dengan menggunakan kromatografi kolom.

Identifikasi struktur molekul dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer FT-IR, LC-MS/MS, dan spektrometer *Nuclear Magnetic Resonance* (^{1}H NMR dan ^{13}C NMR).

Penelitian ini merupakan studi pendahuluan dalam rangka kemandirian bahan baku obat untuk mengatasi HIV/AIDS. Adapun tahapan yang akan ditempuh dalam penelitian ini menuju keluaran produk adalah sebagai berikut:

Tahap I (tahun 2012) : Derivatisasi *Epigallocatechin gallate (EGCG)* dan *Epicatechin gallate (ECG)* dari isolat *catechin Uncaria gambir* Roxb.

Tahap II (tahun 2014) : Kultur beberapa *strain* virus HIV yang berasal dari Indonesia dan uji aktivitas farmakologi senyawa *EGCG* dan *Epicatechin gallate (ECG)* sebagai anti-HIV secara *invitro* (molekuler)

Tahap III (tahun 2015) : Studi interaksi molekuler obat dan reseptor untuk mengetahui mekanisme aksi farmakologi

Tahap IV (tahun 2016) : Studi formulasi senyawa hasil derivatisasi sebagai sediaan antivirus dan studi toksisitas

III. TUJUAN DAN MANFAAT

A. TUJUAN

Tujuan Umum:

Pengembangan obat baru antivirus HIV dari senyawa bahan alam *Uncaria gambir* Roxb.

Tujuan Khusus:

1. Mendapatkan isolat *catechin* dari ekstrak gambir
2. Identifikasi dan karakterisasi *catechin*
3. Mendapatkan senyawa *EGCG* dan *ECG* melalui tahapan derivatisasi dari *catechin*
4. Identifikasi dan karakterisasi senyawa *EGCG* dan *ECG*

B. MANFAAT

Melalui penelitian ini, diharapkan akan didapat senyawa *EGCG* dan *ECG* yang berkhasiat antivirus dan potensial melawan infeksi HIV. Didapatkannya senyawa ini melalui derivatisasi *catechin* merupakan tahap awal pengembangan obat baru untuk HIV/AIDS menuju tercapainya kemandirian bahan baku obat HIV/AIDS.

II. TINJAUAN PUSTAKA

HIV termasuk ke dalam lentivirus yang masuk ke dalam family *Retroviridae*. Di dalam genomnya terdapat 3 gen utama, yaitu: *gag*, *pol* dan *env*. Gen *gag* mengkode protein prekursor Gag yang dibelah oleh protease viral menjadi protein matriks, *capsid*, dan *nucleocapsid*. Gen *pol* mengkode enzim virus yang digunakan untuk memulasi sintesis protein prekursor GagPol. Gen *env* diekspresikan pertama kali sebagai sebuah poliprotein precursor yang dibelah oleh protease seluler menjadi protein permukaan gp120 dan protein transmembran gp41.[16]

Siklus hidup virus HIV terdiri dari 6 tahap yaitu: (1) *binding and fusion*, (2) *reverse transcription*, (3) *integration*, (4) *transcription*, (5) *assembly*,(6) *budding*. Pada tahap *binding and fusion*, Siklus hidup virus HIV dimulai dengan virus yang berikatan dengan reseptor CD4 dan satu dari 2 co-receptor pada permukaan T-limfosit. Kemudian virus berfusi dengan sel inang. Setelah fusi, virus akan melepaskan RNA ke dalam sel inang. Pada tahap *Reverse Transcription*, enzim *reverse transcriptase* akan mengkonversi RNA *single-stranded* menjadi DNA *double-stranded*. Pada tahap *Integration*, DNA HIV yang baru terbentuk masuk ke dalam inti sel inang dan menyisip ke dalam DNA sel inang. DNA yang terintegrasi ini dinamakan provirus. Provirus dapat inaktif untuk beberapa tahun, tidak memproduksi atau memproduksi beberapa kopi HIV. Pada tahap *Transcription*, ketika sel inang menerima sinyal untuk menjadi aktif, provirus menggunakan enzim inang, yaitu RNA *polymerase* untuk mengkopi material genetic HIV menjadi mRNA. Pada tahap *Assembly*, Enzim protease akan memotong rantai panjang protein HIV menjadi protein individual yang lebih kecil. Protein HIV yang lebih kecil akan terkopi bersamaan dengan RNA dan partikel virus yang baru akan terbentuk. Di tahap *budding*, virus baru yang terbentuk akan mendorong keluar dari sel inang dan mengambil sisi luar *envelope* sel yang akan melapisi sel. *Envelope* ini dinamakan HIV *glycoprotein* yang berguna bagi virus untuk berikatan dengan CD4 dan *co-receptor*. Kopi HIV terbaru dapat bergerak untuk menginfeksi sel lainnya.[17]

Obat anti-HIV memiliki target pada tahap-tahap yang berbeda pada siklus hidup virus. Saat ini ada 24 obat yang telah disetujui oleh *Food and Drug Administration* (FDA) Amerika Serikat. Kedua puluh empat obat ini diklasifikasikan menjadi empat kelompok yang berbeda: *Fusion/Entry Inhibitor* (FI), *Reverse Trancriptase Inhibitors* (RT-I), Integrase

Inhibitor (IN), dan *Protease Inhibitor* (PI).[18]

Mutasi genetik yang mengakibatkan resistensi obat meningkat dan terakumulasi pada genom HIV. Hal ini terutama dikarenakan dua alasan yaitu: (a) kurangnya aktivitas pembacaan-bukti RT, menghasilkan laju mutasi yang tinggi per pasang basa dalam setiap siklus replikasi[19] dan (b) laju replikasi virus HIV yang tinggi.[20] Seluruh terapi anti-HIV saat ini selalu mengarah kepada resistensi obat karena mutasi virus yang menjadi salah satu penyebab utama kegagalan terapi.[21] Beberapa tanaman obat yang mengandung terpenoid, kumarin, alkaloid, polifenol, tannin, dan flavonoid telah terbukti mampu memiliki aktivitas anti-HIV.[22]

ECG merupakan inhibitor spesifik dan efektif terhadap aktivitas polimerase virus. ECG juga merupakan inhibitor HIV-1 RT yang poten dengan nilai IC_{50} 0.5μg/ml. Isomer (-) menunjukkan aktivitas inhibitor sedangkan isomer (+) tidak. Untuk sisi ikatan protein bagi ECG masih belum jelas. ECG memiliki potensi kecil sebagai inhibitor HIV-RT.[23] Selain berperan sebagai anti-HIV, ECG dan EGCG juga berperan dalam antivirus influenza. Untuk awal skrining aktivitas antivirus pada influenza, ECG dan EGCG pada konsentrasi 50μM menghambat lebih dari 50% pembentukan plak virus influenza A dan B. ECG lebih baik dalam penghambatan plak pada virus H3N2 sedangkan EGCG lebih dalam penghambatan pada virus influenza B/Yamagata. Sedangkan +(-) katekin hanya mampu menghambat pembentukan 20% plak pada konsentrasi 600μM. Senyawa katekin dan derivatnya mampu menghambat adsorpsi virus ke sel darah merah pada jenis virus influenza yang berbeda dengan tingkat sensitivitas yang berbeda. EGCG memiliki kemampuan menghambat adsorpsi virus influenza ke darah yang lebih baik dibandingkan ECG. ECG dan EGCG menghambat enzim neuraminidase secara signifikan pada konsentrasi tinggi (550 μM dan 350 μM). Melalui uji sitotoksik menggunakan *MTT* assay, nilai CC_{50} ECG lebih tinggi dibandingkan EGCG yang menandakan EGCG lebih toksik dibandingkan ECG. Nilai CC_{50} ECG dan EGCG berturut-turut adalah 525,9 μM dan 275,4 μM. ECG dan EGCG juga menghambat sintesis RNA virus influenza.[24] Studi ini juga menunjukkan gugus galat yang terdapat pada ECG dan EGCG berperan penting dalam aktivitasnya sebagai antivirus.[14,25] Pada sebuah penellitian ditemukan bahwa penambahan rantai panjang acyl (C16-C18) pada EGCG akan menambah aktivitas anti influenza virusnya sebesar 44 kalinya. Kemampuan kimia EGCG melawan degradasi oksidatif juga

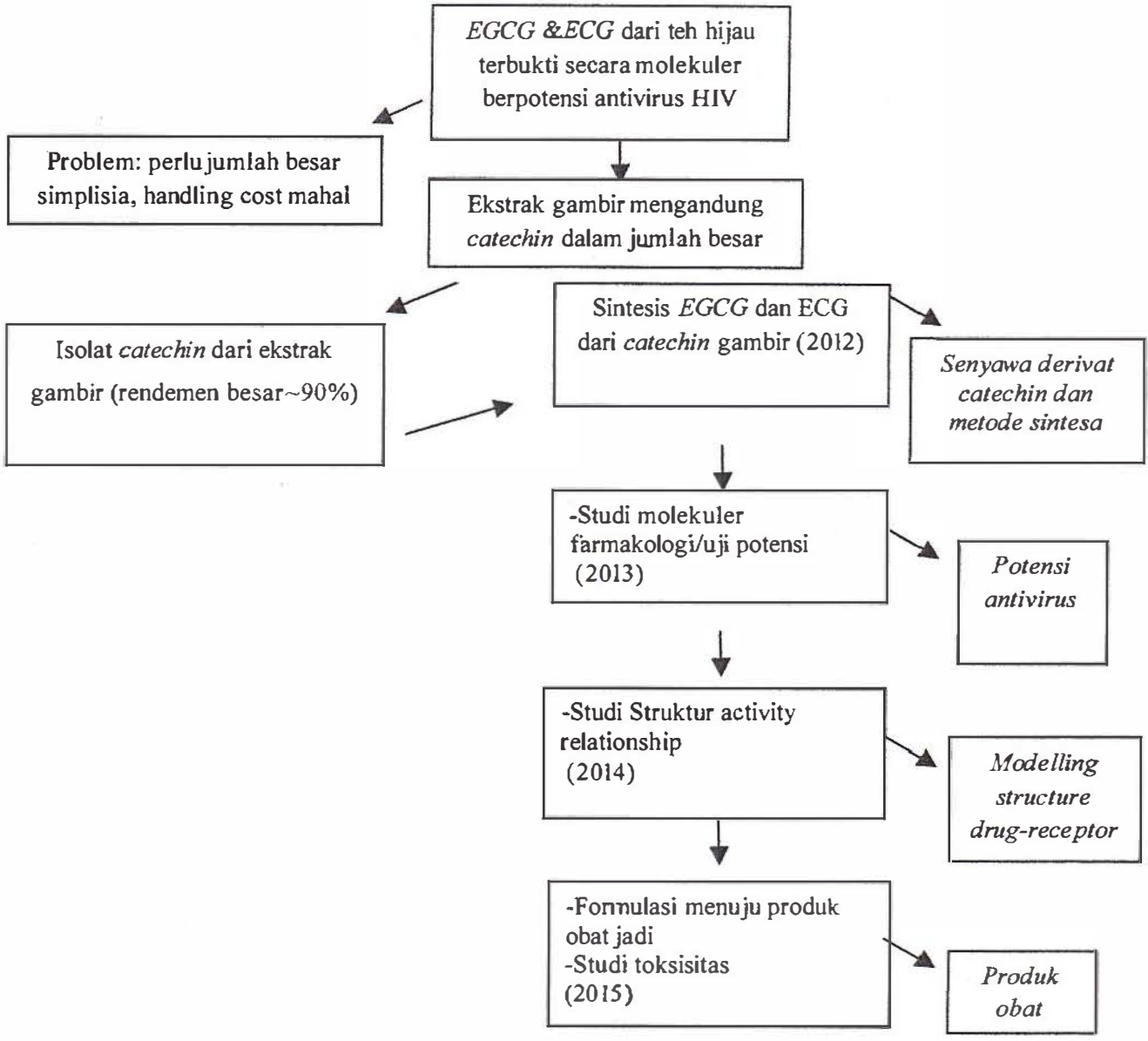
meningkat dengan adanya asilasi.[26] Gugus galat pada kedua senyawa ini berperan penting dalam penghambatan aktivitas HIV-1 RT. [14,25]

IV. PERTANYAAN PENELITIAN

Pada penelitian ini, pertanyaan penelitian yang hendak dijawab adalah: "Apakah *Epigallocatechin gallate (EGCG)* dan *Epicatechin gallate (ECG)* bisa disintesa dari isolat *catechin Uncaria gambir* Roxb.?"

V. METODE

A. KERANGKA PIKIR PENELITIAN



B. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

Ekstrak gambir kualitas 1 diperoleh dari Padang. Tempat pengambilan gambir terpilih akan dicatat. Ekstraksi dengan air dilakukan di Universitas Andalas dengan metode yang telah terstandar. Ekstrak gambir disebut memiliki kualitas I menurut Farmakope

Herbal bila kandungan katekin dalam ekstrak gambir tidak kurang dari 90%. Isolasi, identifikasi dan karakterisasi *catechin* dilakukan di Laboratorium Farmasi Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan. Sintesis, epimerisasi dan derivatisasi akan dilakukan di laboratorium Kimia LIPI, Serpong, Banten. Penelitian akan dilaksanakan selama 8 (delapan) bulan pada tahun 2012.

C. JENIS PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian laboratorium eksperimental (non intervensi)

D. DESAIN PENELITIAN

Penelitian ini bersifat eksploratif

E. SAMPEL PENELITIAN

Sampel adalah ekstrak air gambir kualitas 1 yang berasal dari Padang, yang diekstraksi dari simplisia daun *Uncaria gambir* Roxb. dengan metode standar oleh Universitas Andalas.

F. DATA YANG DIKUMPULKAN:

1. Identitas dan karakter ekstrak gambir
2. Identitas dan karakter isolat *catechin*
3. Identitas dan karakter derivat catechin *(ECG, ECGC)*
4. Rendemen *catechin* dan derivatnya

G. BAHAN DAN PROSEDUR KERJA

1. Bahan

Ekstrak gambir, baku EGCG (Sigma Aldrich), baku EGC (Sigma Aldrich), baku ECG (Sigma Aldrich), baku catechin (Sigma Aldrich), baku catechin gallate (Sigma Aldrich), baku epikatekin (Sigma Aldrich), Baku gallic acid (Sigma Aldrich), ethanol p.a (Merck), ethanol teknis, TFA (Merck), HCL 32% p.a (Merck), acetone p.a (Merck), acetone teknis, toluene p.a (Merck), n-hexane p.a (Merck), n-hexane teknis, Chloroform p.a (Merck), Dichloromethane p.a (Merck), Diethyl ether p.a (Merck), petroleum ether p.a (Merck), dimethyl sulfoxide (Merck), acetic acid glacial (Merck), silica gel 60 Aluminium sheets (Merck), cellulose HPTLC

Aluminium sheets (Merck), merkuri chlorida (Merck), timbal (II) asetat (Merck), anisaldehid solution (Sigma), bismut nitrat (Merck), amonium chlorida (Duchefa), asam formiat (Merck), asam asetat anhidrat (Merck), na asetat anhidrat (Merck), iron (III) chloride (Merck), ethyl acetate p.a (Merck), ethyl acetate teknis, methanol HPLC grade (Merck), acetonitrile HPLC grade, silica gel, benzy chloride, benzyl bromide, kalium karbonat, natrium karbonat, n,n dimethyl formamide, pyridine, methyl gallate, dicyclohexylcarboimide, DMAP, Pd(OH)2/C, 10%Pd/C, tetrahydrofuran, dioxan, H2, reagen test cyanide, iron II LR, manganese LR, nitrate/nitrite-N test, vario sulfat, spadns reagent solution, cooper no 2, ammonia no 1, potasium peroksodisulfat, reagen test chloride, trietilamina, silicon oil, sodium karbonat anhidrat, lanolin, grease glisseal, vaselin, album, pita indikator PH universal, verification standard kit multidirect, eriochrome black T, pipet mikrokapiler, tube kapiler, desiccator, botol dan pyrex bowl.

2. Alat

HPLC, NMR, LC MS/MS, spektrofotometer, *rotavapor,* hotplate, oven, termometer, kondensor, alat gelas.

3. Prosedur kerja

a. Karakterisasi Ekstrak

Karakterisasi ekstrak dilakukan berdasarkan prosedur karakterisasi ekstrak gambir pada Farmakope Herbal. [15]

b. Isolasi catechin

Isolasi catechin dari ekstrak gambir dilakukan dengan isolasi secara langsung dengan etil asetat melalui kolom gravitasi. Setelah elusi, tiap-tiap fraksi yang keluar ditampung dengan erlenmeyer lalu dipekatkan dengan rotavapor. Selanjutnya isolat dikeringkan dalam oven sampai dengan berat tetap dengan suhu 105°C selama 1 jam. Kemudian dari isolat yang didapat, diukur kadar catechin dengan spektofotometer.

c. Purifikasi isolat catechin

Isolat catechin yang didapat dipurifikasi dengan metode Kromatografi Kolom Cair Vakum (KKCV). Untuk satu kali purifikasi, sejumlah 7 gram isolat yang didapat dari tahap isolasi dilarutkan dalam 10 ml metanol dan ditambahkan 21 gram silika gel 60 (impreg). Kolom disiapkan dengan cara memasukkan sejumlah 70 gram silika gel 500 macroporus ke dalam kolom, selanjutnya ditekan sambil divakum. Sampel yang telah diimpreg ke dalam silika gel 60 dimasukkan ke dalam kolom. Elusi dilakukan dengan menggunakan heksan-etil asetat dengan metode gradien eluen (peningkatan kepolaran) dengan tampungan 100 ml. Gradien solven yang digunakan adalah sesuai dengan tabel 1 berikut:

Tabel 1. Gradien solven purifikasi isolat catechin

No.	% Perbandingan Eluen		
	Heksan	Etil Asetat	Metanol
1.	100	0	0
2.	80	15	5
3.	60	35	5
4.	50	45	5
5.	45	55	5
6.	0	100	0
7.	0	0	100

Selanjutnya dimonitor dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Fraksi dengan Rf yang sama dikumpulkan dan dievaporasi.

d. Derivatisasi catechin

Untuk mencari metode yang paling tepat untuk derivatisasi catechin, terlebih dahulu dilakukan optimasi metode. Optimasi dilakukan dengan dua cara yaitu dengan metode tak langsung (proteksi) dan metode langsung.

1). Metode Langsung

Metode ini merupakan metode esterifikasi secara langsung catechin dengan asam gallat, menggunakan katalis asam paratoluensulfuric acid (p-toluen sulfuric acid). Reaksi dilakukan pada suhu 80 °C dengan menggunakan refluks

dan destrak. Pelarut yang digunakan adalah sikloheksana sejumlah 5-10 mL. Digunakan pelarut sikloheksana untuk menangkap air, dikarenakan berat jenis air lebih besar daripada sikloheksana.

Catechin, asam gallat dan p-toluen sulfuric acid yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam labu bundar sintesis. Kemudian ditambah dengan 10 mL sikloheksana. Labu dihubungkan dengan alat refluks dan destrak (diisi dengan sikloheksana sampai atas, hingga menetes ke labu). Kemudian distirer pada suhu 80 °C. Monitoring menggunakan eluen heksana dan etil asetat pada t=5 jam, 23 jam dan 29 jam.

2). Metode Tak Langsung

Metode tak langsung meliputi 4 tahap yaitu tahap proteksi, hidrolisis, esterifikasi dan purifikasi.

2.a) Tahap Proteksi

Proteksi dilakukan baik terhadap catechin maupun methyl gallate. Pelarut yang digunakan adalah DMF (dimetil formamida). Reaksi dilakukan pada suhu ruang. Untuk proteksi catechin, sebagai gugus pelindung, digunakan benzyl chloride. Benzyl chloride merupakan leaving group yg baik. Perbandingan catechin dan benzil chlorida setelah optimasi adalah 1:8. Sebelumnya dipakai perbandingan 1:6 namun hasilnya kurang optimal. Sejumlah 4,05 mmol catechin dan 32,4 mmol benzil klorida dimasukkan ke dalam labu sintesis, kemudian ditambah dengan 27,2 mmol Na_2CO_3 dan pelarut DMF, distirer dan ditutup rapat, direaksikan pada suhu ruang selama 74 jam. Monitoring produk menggunakan KLT dengan eluen heksan dan etil asetat dengan perbandingan 3:7. Setelah reaksi selesai, hasil reaksi dinetralisasi dengan NaOH 1%, diekstrak dengan etil asetat dan air, kemudian diambil fraksi etil asetat, dikeringkan dengan $MgSO_4$ anhidrat dan dievaporasi. Selanjutnya dilakukan pemurnian menggunakan kromatografi kolom gravitasi dengan fasa diam silika gel dan eluen heksan:etil asetat (3:7).

Proteksi methyl gallate sebelumnya telah diuji coba menggunakan perbandingan methyl gallate dan benzil klorida sebanyak 3:10 dan 1:6, namun hasil yang lebih optimal adalah pada perbandingan 3:10. Sebanyak 3 mmol methyl gallate dicampur dengan 10 mmol benzil klorida dan dimasukkan ke dalam labu sintesis. Selanjutnya ditambah dengan 21 mmol Na_2CO_3. Pelarut yang digunakan adalah DMF. Reaksi dilakukan pada suhu ruang dengan distirer dan ditutup rapat selama 38 jam. Monitoring produk dilakukan dengan menggunakan KLT dengan eluen heksan:etil asetat (7:3). Setelah reaksi selesai, hasil reaksi dinetralisasi dengan NaOH 1%, diekstrak dengan etil asetat dan air, diambil fraksi etil asetat, dikeringkan dengan $MgSO_4$ anhidrat dan dievaporasi. Selanjutnya dilakukan pemurnian menggunakan kromatografi kolom gravitasi, dengan fasa diam silika gel dan eluen heksan:etil asetat (7:3) dengan tampungan 10 ml tiap fraksi.

2.b). Tahap Hidrolisis

Methyl gallate setelah diproteksi dan dimurnikan dengan kromatografi kolom gravitasi sebanyak 158,8 mg, selanjutnya dihidrolisis untuk merubah gugus metoksi pada asam gallate menjadi gugus hidroksil (asam gallate). Hidrolisis methyl gallate dilakukan dengan menambahkan 3mL NaOH 2M dan 5 mL etanol, distirer dan ditutup rapat, direaksikan pada suhu 55°C. Monitoring produk dilakukan dengan KLT menggunakan eluen Heksan: etil asetat (3:7).

2.c). Tahap Esterifikasi

Proses esterifikasi dilakukan untuk menggabungkan molekul catechin (Tris-benzyl-catechin gallate) dengan asam gallate . 0,0247 mmol Tris-benzyl-catechin gallat dimasukkan ke dalam labu sintesis bersama dengan 0,0247 mmol hasil hidrolisis (Tris-benzyl gallic acid). Selanjutnya ditambah dengan katalis 0,0247 mmol N,N'-Dicyclohexyl-carbodiimide (DCC) dan 0,0049 mmol (1/5 dari mol Tris-benzyl-catechin gallate) 4-dimethylamino-pyridine (DMAP). Kemudian

ditambah pelarut kloroform 4 ml. Reaksi dilakukan pada suhu ruang, ditutup rapat dan distirer selama 5 jam.

2.c). Tahap Purifikasi

Setelah proses esterifikasi maka dilakukan proses pemurian menggunakan kromatografi kolom gravitasi dengan fasa diam silika gel dan gradien eluen heksan:etil asetat dengan perbandingan sebagaimana berikut dalam tabel 2 berikut:

Tabel 2. Gradien solven purifikasi catechin gallate

No.	% Perbandingan Eluen	
	Heksan	Etil asetat
1.	100	0
2.	90	10
3.	80	20
4.	70	30
5.	50	50
6.	0	100

VI. HASIL

A. HASIL KARAKTERISASI EKSTRAK GAMBIR

Setelah dilakukan karakterisasi ekstrak gambir dengan prosedur mengikuti Farmakope Herbal dilanjutkan dengan penetapan kadar catechin menggunakan spektrofotometer, didapatkan hasil sebagaimana tercantum pada tabel 3 berikut:

Tabel 3. Hasil karakterisasi ekstrak gambir

Parameter	Hasil (%)
Susut pengeringan	16,04 ± 0,035
Kadar Air	11,96 ± 0,035
KadarAbu Total	1,01 ± 0,035
Kadar Abu Tidak Larut Asam	0,42 ± 0,099
Kadar Catechin	92,45 ± 0,247

B. HASIL ISOLASI CATECHIN

Setelah dilakukan isolasi catechin dari ekstrak gambir dengan menggunakan kolom gravitasi dengan etil asetat sebagain eluen, didapatkan isolat catechin dengan kadar 99,80%± 0,132.

C. HASIL PURIFIKASI ISOLAT CATECHIN

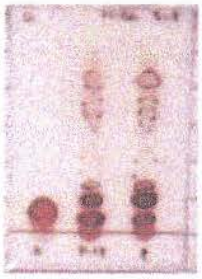
Dari hasil KKCV diperoleh empat fraksi. Fraksi yang memiliki Rf sama dengan baku catechin adalah fraksi 2. Fraksi 2 dievaporasi kemudian ditimbang beratnya. Untuk tahap pertama diperoleh berat fraksi sebanyak 5,2354 gram.

Gambar 3. Purifikasi isolat catechin dengan metode KKCV

D. HASIL DERIVATISASI CATECHIN

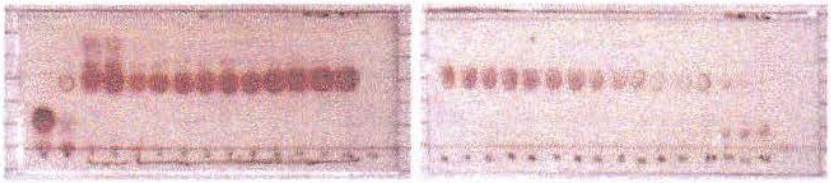
1). Catechin terproteksi (5,7-bis(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)chroman-3-ol)

Hasil monitoring terbentuknya produk catechin terproteksi dengan metode KLT setelah 74 jam adalah sebagai berikut:



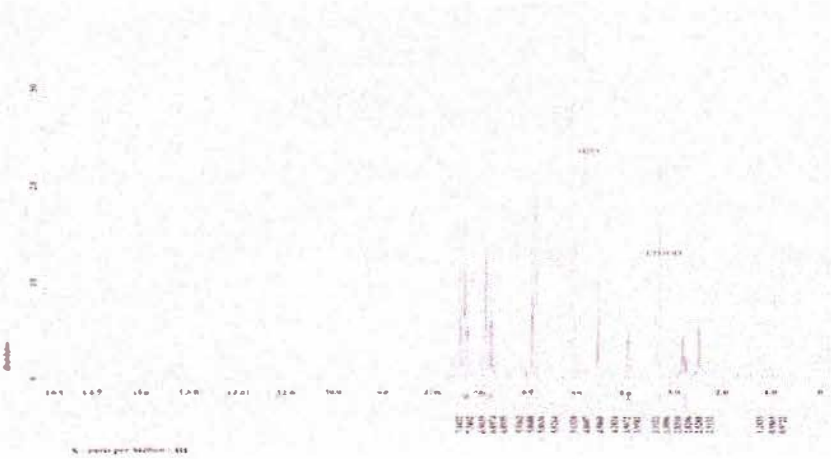
Gambar 4. Hasil KLT proses proteksi catechin. K= isolat catechin, K+P = isolat catechin dan produk catechin terproteksi, P= produk catechin terproteksi. Eluen yang digunakan adalah heksan: etil asetat (3:7). Fase diam adalah silika gel GF.

Pada proses pemurnian catechin terproteksi, fraksi-fraksi dari kolom yang didapat dimonitor dengan KLT dengan hasil sebagai berikut:

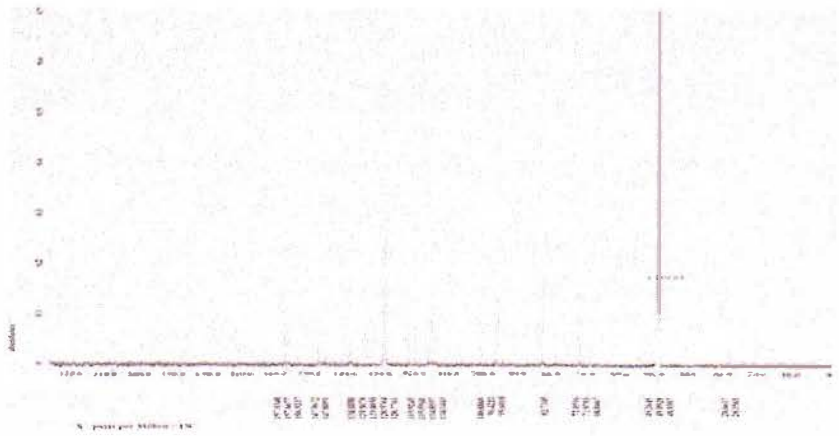


Gambar 5. Hasil KLT proses purifikasi catechin terproteksi. K= isolat catechin. Berurutan dari kiri ke kanan adalah fraksi-fraksi yang ditampung. Produk catechin terproteksi terlihat pada fraksi ke-1 sampai dengan fraksi ke-22. Eluen yang digunakan adalah heksan: etil asetat (3:7). Fase diam adalah silika gel GF.

Setelah fraksi-fraksi yang mengandung catechin terproteksi dikumpulkan dan dievaporasi, dilakukan identifikasi dengan NMR proton dan carbon dengan hasil berikut ini:



Gambar 6. Spektra ^{1}H-NMR 5,7-bis(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)chroman-3-ol (senyawa hasil proteksi catechin)

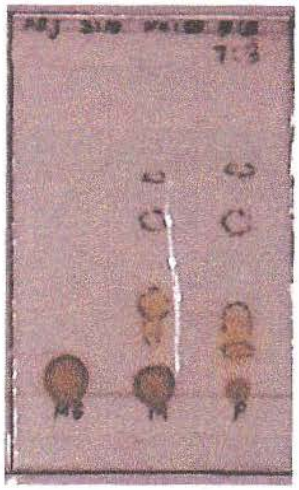


Gambar 7. Spektra ^{13}C-NMR 5,7-bis(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)chroman-3-ol (senyawa hasil proteksi catechin)

Hasil NMR diatas menunjukkan bahwa catechin terproteksi telah terbentuk .

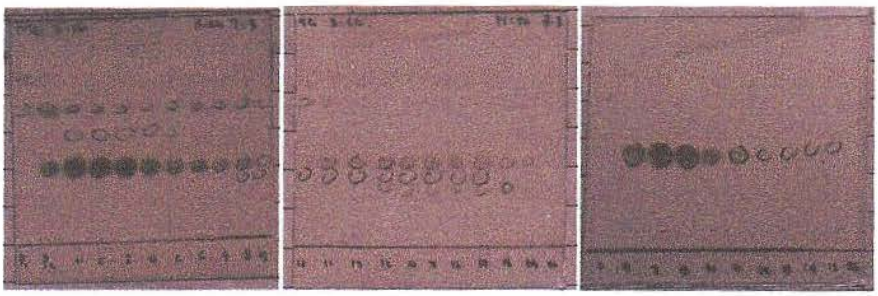
2). Methyl gallate terproteksi (methyl 3,4,5-tris (benzyloxy) benzoate)

Hasil monitoring terbentuknya produk methyl gallate terproteksi dengan metode KLT setelah 74 jam adalah sebagai berikut:



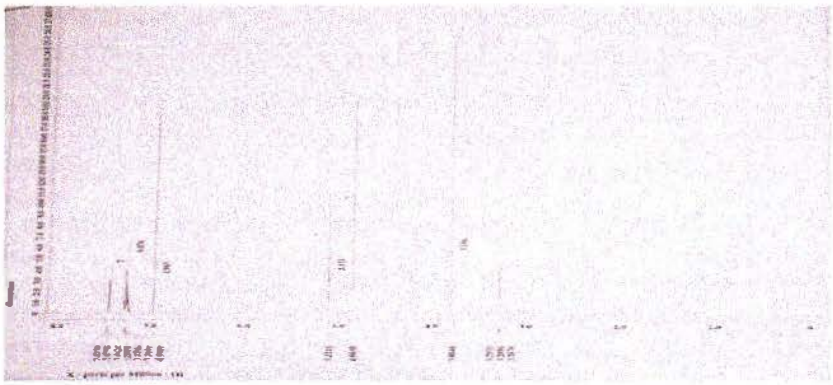
Gambar 8. Hasil KLT proses proteksi methyl gallate. MG= methyl gallate, M = methyl gallate dan produk methyl gallate terproteksi, P= produk methyl gallate terproteksi. Eluen yang digunakan adalah heksan: etil asetat (7:3). Fase diam adalah silika gel GF.

Pada proses pemurnian methyl gallate terproteksi, fraksi-fraksi dari kolom yang didapat dimonitor dengan KLT dengan hasil sebagai berikut:

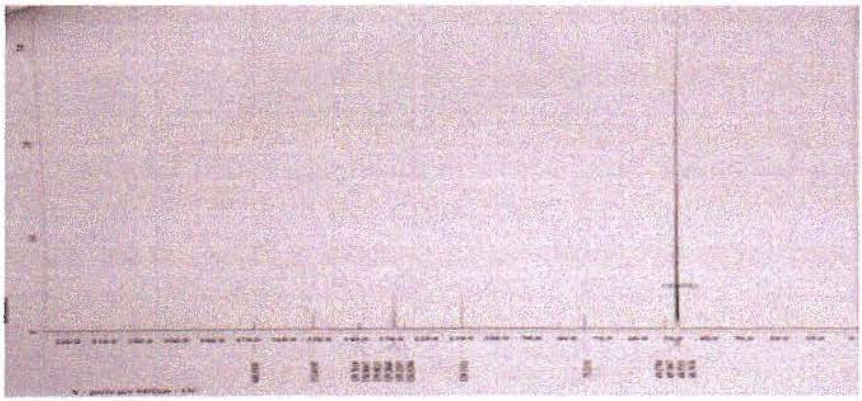


Gambar 9. Hasil KLT proses purifikasi catechin terproteksi. P1= methyl gallate. P2= methyl gallate dan produk methyl gallate terproteksi. Berurutan dari kiri ke kanan adalah fraksi-fraksi yang ditampung. Produk methyl gallate terproteksi terlihat pada fraksi ke-1 sampai dengan fraksi ke-18. Eluen yang digunakan adalah heksan: etil asetat (7:3). Fase diam adalah silica gel GF.

Setelah fraksi-fraksi yang mengandung methyl gallate terproteksi dikumpulkan dan dievaporasi, dilakukan identifikasi dengan NMR proton dan carbon dengan hasil berikut ini:



Gambar 10. ^{1}H-NMR methyl 3,4,5-tris (benzyloxy) benzoate

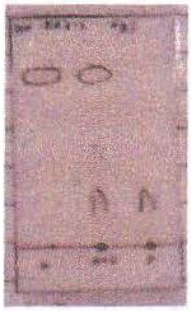


Gambar 11. ^{13}C-NMR methyl 3,4,5-tris (benzyloxy) benzoate

Hasil NMR tersebut menunjukkan bahwa methyl gallate terproteksi telah terbentuk.

3). Hasil hidrolisis (3,4,5-tris (benzyloxy) benzoic acid)

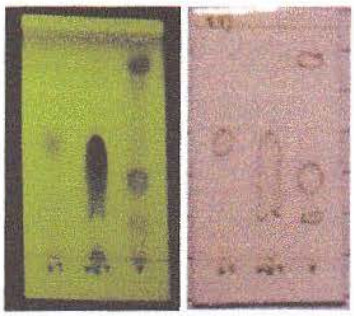
Hasil hidrolisis methyl 3,4,5-tris (benzyloxy) benzoate menjadi 3,4,5-tris (benzyloxy) benzoic acid setelah dimonitor dengan KLT setelah 2 jam reaksi hidrolisis adalah sebagai berikut:



Gambar 12. Hasil KLT proses hidrolisis methyl 3,4,5-tris (benzyloxy) benzoate menjadi 3,4,5-tris (benzyloxy) benzoic acid. A = methyl 3,4,5-tris (benzyloxy) benzoate, A+P = methyl 3,4,5-tris (benzyloxy) benzoate dan 3,4,5-tris (benzyloxy) benzoic acid. P = 3,4,5-tris (benzyloxy) benzoic acid. Eluen yang digunakan adalah heksan: etil asetat (3:7). Fase diam adalah silika gel GF.

4). Hasil esterifikasi

KLT hasil esterifikasi molekul Tris-benzyl-catechin gallate dengan asam gallate setelah setelah 5 jam reaksi esterifikasi dengan pelarut kloroform adalah sebagai berikut:



Gambar 13. Hasil KLT proses esterifikasi Tris-benzyl-catechin gallate dengan asam gallate di bawah sinar UV (kiri) dan dilihat secara langsung (kanan). KT = Tris-benzyl-catechin gallate. KT+P = catechin gallate dan produk esterifikasi (catechin gallate). P = produk esterifikasi (catechin gallate). Eluen yang digunakan adalah heksan: etil asetat (3:7).

VII. PEMBAHASAN

Pada tahap awal penelitian ini dilakukan karakterisasi sampel ekstrak gambir. Karakterisasi ini dimaksudkan agar dapat menjamin bahwa produk mempunyai nilai parameter tertentu yang konstan. Berdasarkan hasil karakterisasi, kadar air ekstrak gambir yang diperoleh yaitu 11,96% ± 0,035% yang berarti ekstrak gambir tersebut telah memenuhi persyaratan Farmakope Herbal, yaitu tidak melebihi 14%. Penetapan kadar air ini bertujuan untuk menghindari cepatnya pertumbuhan jamur dalam ekstrak (Soetanto dan Soediro, 1997). Kadar air yang cukup tinggi dari ekstrak ini dikarenakan catechin memiliki banyak gugus hidroksi yang mengakibatkan ekstrak bersifat higroskopis sehingga ekstrak perlu disimpan didalam desikator. Kadar susut pengeringan ekstrak sebesar 16,04% ± 0,035%. Susut pengeringan memiliki nilai yang lebih besar dari kadar air. Hal ini menunjukkan bahwa selain air, minyak atsiri, juga ikut menguap pada suhu 105 °C.

Kadar abu total dan kadar abu tidak larut asam ditemukan sebesar 1,01% ± 0,35% dan 0,42% ± 0,099% yang berarti bahwa sampel ekstrak gambir telah memenuhi persyaratan Farmakope Herbal. Kadar abu total dan kadar abu tidak larut asam menggambarkan kandungan mineral dalam ekstrak. Pada penetapan kadar abu total dan kadar abu tidak larut asam, ekstrak dipanaskan pada suhu 700°C yang mengakibatkan senyawa organik menguap sehingga menyisakan senyawa mineral dan anorganik saja. Dalam hal ini kadar abu total menunjukkan sisa senyawa anorganik dalam ekstrak sedangkan kadar abu larut tidak larut asam menunjukkan kandungan unsur anorganik yang tidak larut asam.

Pemeriksaan organoleptik ekstrak meliputi bentuk, warna, bau, dan rasa. Dari hasil pengamatan didapatkan hasil ekstrak berbentuk padatan berwarna coklat kemerahan dengan rasa pahit. Penentuan organoleptik ini ditentukan dengan panca indera dan bertujuan untuk pengenalan awal secara sederhana yang masih bersifat subjektif.

Berdasarkan hasil spektrofotometri, kadar catechin dari ekstrak diperoleh sebesar 92,45% ± 0,247%. Kadar ini telah memenuhi persyaratan Farmakope Herbal dimana kadar catechin pada ekstrak gabir kualitas 1 tidak boleh kurang dari 90%. Hal ini menunjukkan bahwa kualitas dari sampel ekstrak *Uncaria gambir* Roxb tersebut baik.

Kandungan kimia terbanyak dari ekstrak gambir adalah catechin. Isolasi catechin dilakukan berdasarkan perbedaan kelarutan menggunakan pelarut dengan berbagai tingkat kepolaran. Pelarut yang kepolarannya mendekati kepolaran air seperti metanol, alkohol, eter atau aseton digunakan untuk melarutkan catechin. Demikian pula dengan pelarut jenis semi polar, pelarut jenis ini masih dapat melarutkan catechin dengan baik seperti etil asetat dan kloroform. Senyawa yang diduga bukan catechin tidak akan larut. Dari percobaan yang telah dilakukan sebelumnya diperoleh bahwa catechin dapat larut paling baik dalam etil asetat (Robinson, trevor: 1995,208), sehingga dalam penelitian ini digunakan metode isolasi secara langsung dengan pelarut etil asetat untuk mengisolasi catechin dari ekstrak gambir. Selain itu, isolasi secara langsung dilakukan juga karena di dalam ekstrak gambir kualitas 1 terdapat kandungan catechin dalam jumlah yang besar. Dari isolasi yang dilakukan diperoleh hasil isolat sebesar 80,74%.

Untuk menghilangkan senyawa selain catechin di dalam isolat dan untuk memperoleh kadar catechin yang lebih tinggi, dilakukan tahap selanjutnya yaitu pemurnian atau purifikasi dengan metode KCKV. Berdasarkan hasil KLT dan analisa LC/MS-MS, didapatkan senyawa catechin murni yang selanjutnya menjadi *starting material* pada tahap derivatisasi. Kadar catechin setelah purifikasi dan diukur dengan spektrofotometri yaitu 99,80%± 0,132.

Derivatisasi catechin dilakukan menggunakan catechin mumi yang diperoleh dari tahap purifikasi sebelumnya. Derivat catechin yang pertama yang akan disintesa adalah catechin gallat yang selanjutnya akan menjade *epicatechin gallate (ECG).*

Setelah dilakukan optimasi metode dengan perubahan waktu (lamanya reaksi) serta konsentrasi reaktan selama 4 (empat) kali percobaan, temyata derivatisasi catechin dengan metode langsung tidak menghasilkan produk yang diharapkan. Oleh karena itu, percobaan dilanjutkan dengan metode lain yaitu metode tidak langsung atau dengan sistem proteksi gugus hidroksil. Metode ini lebih panjang langkahnya dan lebih lama, tetapi memungkinkan masuknya gugus hidroksi terpilih pada catechin terproteksi pada gugus karbonil asam galat dengan melepaskan molekul H_2O.

Sintesa catechin gallat dilakukan dengan esterifikasi catechin dengan asam gallat. Esterifikasi dilakukan pada gugus OH pada posisi carbon nomor 3 saja. Oleh karena itu,

sebelum esterifikasi perlu dilakukan proteksi pada gugus OH lainnya agar methyl gallat hanya menyerang gugus OH yang menjadi target.

Gambar 14. Reaksi proteksi catechin dengan benzyl chloride.

Proteksi catechin dilakukan dengan menggunakan benzyl chloride (gambar 14). Setelah diproteksi akan terbentuk tetrabenzil catechin sehingga methyl gallat hanya memiliki peluang menyerang gugus OH yang bebas. Benzyl chloride dipilih karena Cl merupakan living group yang baik dan benzil tidak memiliki gugus OH.

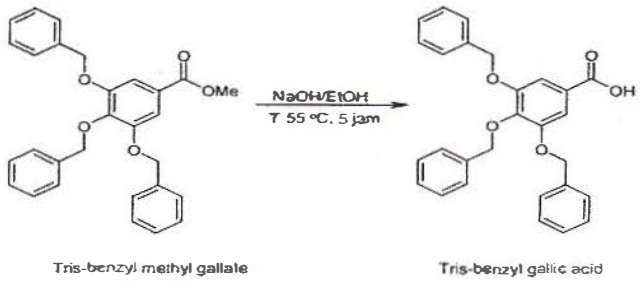
Reaksi ini menggunakan catechin dan benzyl chloride dengan perbandingan 1:4 dan 1:8. Jumlah benzyl chloride jauh lebih besar daripada jumlah catechin agar reaksi berlangsung lebih cepat atau kesetimbangan reaksi cenderung ke kanan. Dalam reaksi ini juga ditambahkan Na_2CO_3 untuk menarik proton (H) yang berasal dari gugus OH yang telah terproteksi. Pelarut yang digunakan adalah DMF (dimetil formamida) dengan jumlah secukupnya, jika terlalu banyak akan sulit dihilangkan. Reaksi berlangsung pada temperatur ruang dan distirer selama 74 jam. Monitoring dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Dari proses KLT ini diperoleh perbandingan eluen yang sesuai yaitu heksan dan etil asetat dengan perbandingan 3:7. Dari hasil KLT dapat dilihat bahwa reaksi dengan perbandingan 1:8 menghasilkan spot yang lebih bagus, maka hasil reaksi inilah yang dipilih untuk tahap selanjutnya.

Setelah reaksi selesai (dilihat dari monitoring KLT tidak terdapat lagi spot catechin) dilakukan pemurnian produk dengan metode KKG (kromatografi kolom gravitasi) menggunakan eluen heksan dan etil asetat dengan perbandingan 3:7. Dari tahap ini diperoleh senyawa yang murni yang dikonfirmasi dengan analisa NMR dan LCMS (gambar 6 dan 7).

gugus hidroksinya. Hal ini ditunjukkan dengan adanya peak singlet tinggi pada pergeseran kimia (∂) 5,13 ppm yang merupakan peak dari proton metoksi dari gugus benzyl. Keberadaan substitusi gugus benzyl pada struktur catechin juga didukung dengan adanya peak multiplet pada ∂ 6,8 dan 7,34 ppm. Data spektra ^{13}C-NMR (gambar 7) memperkuat adanya substitusi gugus benzyl pada struktur catechin yang ditunjukkan dengan sedikitnya ada 43 karbon dari spektra ^{13}C-NMR yang merupakan jumlah karbon dari produk proteksi. Substitusi gugus benzyl pada struktur ditandai dengan adanya pergeseran kimia karbon metoksi pada ∂ 68,85 dan 72,05 ppm serta adanya pergeseran kimia karbon aromatik pada sekitar ∂ 129 ppm.

Pada spektra proton NMR gambar 10 terlihat bahwa substitusi gugus benzyl ditunjukkan dengan sinyal multiplet proton aromatik pada pergeseran kimia 7,31 dan 7,49 ppm serta karbon metoksi yang terikat aromatik pada pergeseran kimia 4,88 dan 5,14 ppm. Berdasarkan spektra karbon NMR pada gambar 11, gugus benzyl tersubstitusi pada methyl gallate ditunjukkan dengan sedikitnya ada 28 buah karbon yang merupakan jumlah karbon produk proteksi methyl gallate. Selain itu terdapat sinyal karbon metin aromatik dari gugus benzyl pada ∂ sekitar 129 ppm dan karbon kuartener pada ∂ sekitar 139 ppm. Bukti lain ditunjukkan dengan adanya sinyal karbon oksi yang terikat pada aromatic pada ∂ 75,21 ppm.

Catechin terproteksi yang telah disintesa pada proses sebelumnya bersifat sangat nonpolar sehingga dibutuhkan asam karboksilat yang bersifat nonpolar juga agar dapat larut dengan baik dan reaksi esterifikasi dapat terjadi. Asam karboksilat yang akan digunakan adalah 3,4,5-tris-(benzyloxy) benzoic acid yang dibuat dengan dua tahap yaitu penambahan benzyl pada methyl gallat lalu dihidrolisis (lihat gambar 15). Hidrolisis menggunakan NaOH dan etanol untuk membentuk gugus karboksil. Reaksi hidrolisis menghasilkan satu produk sehingga tidak perlu proses pemurnian.



Gambar 15. Reaksi hidrolisis tris-benzyl methyl gallate menjadi tris-benzyl gallic acid

Proses selanjutnya adalah esterifikasi dengan cara mereaksikan katekin terproteksi dan 4,5,6-tris-benzyl-gallic acid menggunakan pelarut kloroform, katalis DMAP dan aktivator DCC, pada temperatur ruang selama 5 jam. 3,4,5-tris-(benzyloxy) benzoic acid akan menyerang satu-satunya gugus OH pada tetrabenzyl catechin sehingga esterifikasi lebih mudah terjadi. Ester yang terbentuk adalah benzyl-catechin gallate.

Monitoring dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Dari proses KLT ini diperoleh perbandingan eluen yang sesuai yaitu heksan dan etil asetat dengan perbandingan 3:7. Setelah reaksi selesai (dilihat dari monitoring KLT tidak terdapat lagi spot asam gallat terproteksi dan katekin terproteksi) dilakukan pemurnian produk dengan metode KKG (kromatografi kolom gravitasi) menggunakan eluen heksan dan etil asetat dengan perbandingan 3:7. Dari tahap ini diperoleh senyawa yang murni dikonfirmasi dengan analisa NMR dan LCMS.

Senyawa target kedua yaitu *Epigallocatechin gallate (ECGC)* ternyata tidak memungkinkan untuk disintesa dengan cara derivatisasi catechin. Hal ini dikarenakan gugus hidrogen pada catechin tidak selektif untuk penambahan satu molekul hidroksil, yang merupakan pembeda dengan senyawa *epicatechin gallate (ECG)*. Ada kemungkinan reaksi bisa berlangsung namun memerlukan cold chain handling yang cukup rumit karena reaksi harus berlangsung pada suhu -70°C, dan reagen yang digunakan pun memerlukan *cold chain* pada suhu tersebut. Hal ini bisa menjadi pertimbangan pada penelitian selanjutnya.

VIII. KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Penelitian ini telah berhasil mendapatkan isolat catechin dari ekstrak *Uncaria gambir* Roxb. Isolat catechin yang didapat setelah dimurnikan dengan metode kromatografi kolom vakum telah berhasil diidentifikasi dan dikarakterisasi dengan HPLC, LC MS/MS dan NMR. Kadar catechin setelah purifikasi dan diukur dengan spektrofotometri yaitu 99,80%± 0,132.

Proses untuk memperoleh senyawa Epicatechin gallate (ECG) dan Epigallocatechin gallate (EGCG) dilakukan dengan metode derivatisasi tidak langsung yang dilanjutkan dengan identifikasi dan karakterisasi senyawa menggunakan KLT, LC MS dan NMR. Senyawa ECG dan EGCG belum terbentuk secara optimal. Namun, senyawa epimer dari ECG, yaitu catechin gallate, telah berhasil diperoleh.

B. SARAN

Untuk pengembangan derivat catechin sebagai kandidat bahan baku senyawa antiretroviral, perlu penelitian lanjut untuk menghasilkan derivat tersebut pada skala produksi agar derivat catechin bisa lebih berpotensi dikembangkan secara mandiri di Indonesia.

Selanjutnya, karena senyawa catechin dan catechin gallate juga potensial sebagai antiretroviral terhadap HIV, perlu uji farmakologi lebih dalam untuk mengetahui mekanisme aksi dan seberapa besar potensinya sebagai kandidat senyawa antiretroviral.

IX. UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih diucapkan kepada semua pihak yang telah berperan serta dalam mendukung terlaksananya penelitian ini antara lain Badan Litbang Kesehatan atas pendanaan, Pusat Kimia Terapan LIPI dan khususnya Prof. Dr. M. Hanafi sebagai konsultan, serta semua anggota tim penelitian yang telah bekerja sama dengan baik sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik.

X. DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Ditjen PPM dan PL Kemkes RI. *Statistik kasus HIV/AIDS di Indonesia.* 2010. Diunduh dari: http://www.penyakitmenular.info 01/03/2011

2. Shekelle P, Maglione M, Geotz MB, Wagner G, Wang Z, Hilton L, Carter J, Chen S, Tringle C, Mojica W, Newberry S. Antiretroviral (ARV) drug resistance in the developing world. *Evidence Report/Technology Assessment.* 2007;(156):1-74.

3. Tillekeratne LMV, Sherette A, Grossman P, Hupe L, Hupe D, dan Hudson RA. Simplifies catechin-gallate inhibitors of HIV-1 Reverse Transcriptase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2001;11:2763-67.

4. Badan Litbang Kesehatan Kemkes RI. *Laporan Nasional Riset Kesehatan Dasar tahun 2010.* Diunduh dari: http://www.litbang.depkes.go.id 02/03/2011.

5. Dhalimi, A. Permasalahan gambir (*Uncaria gambir, L*) di Sumatera Barat dan alternatif pemecahannya. *Perspektif.* 2005; 5 (4):46-59.

6. Zein, U. Pemanfaatan tumbuhan obat dalam upaya pemeliharaan kesehatan. *e-USU Respository.* 2005. Universitas Sumatera Utara.

7. Pambayun, R., Gardjito, M., Sudarmaji, S. dan Kuswanto, KR. Kandungan fenol dan sifat antibakteri dari berbagai jenis ekstrak produk gambir (*Uncaria gambir* Roxb.). *Majalah Farmasi Indonesia.* 2007;18(3):141-146.

8. Isnawati, A. Analisa kualitatif dan kuantitatif senyawa katekin dan kuersetin pada 3 kualitas mutu ekstrak gambir. *Laporan Penelitian.* Pusat penelitian dan pengembangan biomedis dan farmasi badan litbang kesehatan. 2009.

9. Kassim MJ, Hussin MH, Achmad A, Dahon NH, Suan TK, Hamdan HS. Determination of total phenol, condensed tannin and flavonoid contents and antioxidant activity of *Uncaria gambir* extracts. *Majalah Farmasi Indonesia.* 2011;22(1):50-9.

10. Hamza A, dan Zhan, CG, How can (-)-Epigallocatechin Gallate from green tea prevent HIV-1 infection? Mechanistic insights from computational modelinh and the implication for rational design of anti-HIV-1 entry inhibitors. *Journal of Physical Chemistry B.*2006;110:2910-17.

11. Zhongguo Yi XUe Ke Xue Yuan Xue Bao. The inhibitory effects of catechin derivates on the activities of human immunodeficiency virus reverse transcriptase and DNA polymerases. *Acta Academiae Medicinae Siniciae.*1992;14(5):334-8 (Abstract).

12. Jiang F, Chen W, Yi K, Wu Z, Si Y, Han W dan Zhao Y, The evaluation of catechins that contain a galloyl moiety as potential HIV-1 integrase inhibitors. *Clinnical Immunology.* 2010;137:347-56.

13. Williamson MP, McCormick TG, Nance CL. Epigallocatechin gallate, the main

polyphenol in green tea, binds to the T-cell receptor, CD4: potential for HIV-1 therapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2006;118(6):1369-74.

14. Yamaguchi K, Honda M, Ikigai H, Hara Y, Shimamura T. Inhibitory effects of *epigallocatechin* gallate on the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Antiviral Research.* 2002;53(1):19-34.

15. Kementerian Kesehatan R.I. *Farmakope Herbal Indonesia.* 2008. Edisi I. Jakarta : Dirjen Pelayanan Farmasi dan Alat Kesehatan.

16. Johnson SC dan Gerber JG. Advances in HIV/AIDS Therapy. *Advance Internal Medicines.* 2000;45: 1-40.

17. Freed EO. HIV-1 Replication. *Somatic Cell and Molecular Genetics.* 2001;26: 13-33.

18. Anonim. The HIV Life Cycle. AIDSinfo.2005. Diunduh dari http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/HIVLifeCycle_FS_en.pdf.

19. Mansky LM dan Temin HM. Lower in vivo Mutation Rate of Human Immunodeficiency Virus Type 1 that Predicted from the Fidelity of Purified Reverse Transcriptase. *Journal of Virology.* 1995;69: 5087-94.

20. Macneil A, Sarr AD, Sankale JL, Meloni ST, Mboup S, dan Kanki P. Direct Evidence of Lower Viral Replication Rates In Vivo in Human Immunodeficiency Virus Type 2 (HIV-2) Infection than In HIV-1 Infection. *Journal of Virology.*2007;81:5325-30.

21. Flexner C. HIV Drug Development: The Next 25 Years. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2007;6:959-66.

22. Hupfeld J dan Efferth T. Review: Drug Resistance of Human Immunodeficiency Virus and Overcoming it by Natural Products. *In vivo.*2009; 23: 1-6.

23. Moore PS dan Pizza C. Observation on the Inhibition of HIV-1 Reverse Transcriptase by Catechins. *Biochemistry Journals.* 1992;288:717-719.

24. Song JM, Lee KH, dan Seong BL. Antiviral Effect of Catechins in Green Tea on Influenza Virus. *Antiviral Research.* 2005; 68: 66-74.

25. Chang CW, Hsu FL, dan Lin JY. Inhibitory Effects of Plyphenolic Catechins from Chinese Green Tea on HIV Reverse Transcriptase Activity. *Journal Biomedical Science.* 1994; 1: 1633-166.

26. Mori, S., Miyake, S., Kobe, T., Nakaya, T., Fuller, S. D., Kato, N., and Kaihatsu, K. Enhanced anti-influenza A virus activity of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate fatty acid monoester derivatives: effect of alkyl chain length. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters.* 2008; 18, 4249-4252.

LAMPIRAN

PERSETUJUAN ATASAN YANG BERWENANG

Jakarta, Januari 2013

Mengetahui,

Kepala Bidang Teknologi Dasar Kesehatan

Dr. Vivi Lisdawati, MSc., Apt.

NIP. 196811181996032001

Ketua Pelaksana

Lina Rustanti, M.Mol.Biol, Apt.

NIP. 198006172005012002

DISETUJUI,

Ketua

Panitia Pembina Ilmiah

Dr. drg. Magdarina Destri Agtini, M.S.

NIP. 195012061984022001

Kepala

Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan

KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

Drs. Ondri Dwi Sampurno, MSi., Apt.

NIP. 196211191988031001

KEMENTERIAN KESEHATAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
Jalan Percetakan Negara No. 29 Jakarta 10560 Kotak Pos 1226
Telepon: (021) 4261088 Faksimile: (021) 4243933
E-mail: sesban@litbang.depkes.go.id, *Website:* http://www.litbang.depkes.go.id

PEMBEBASAN PERSETUJUAN ETIK (*EXEMPTED*)

Nomor : KE.01.04/EC/ 224/2012

Yang bertanda tangan di bawah ini, Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Litbang Kesehatan, setelah dilaksanakan pembahasan dan penilaian, dengan ini memutuskan protokol penelitian yang berjudul :

"Studi Derivat Catechin sebagai Bahan Baku Antivirus HIV. Tahap I : Derivatisasi Isolat Catechin Uncaria Gambir Roxb"

dengan Ketua Pelaksana/Peneliti Utama: **Lina Rustanti, M. Mol. Biomol, Apt**

dapat dibebaskan dari keharusan memperoleh persetujuan etik (*Exempted*) untuk pelaksanaan penelitian tersebut. Pembebasan ini berlaku sejak dimulai dilaksanakannya penelitian tersebut di atas sampai dengan selesai sesuai yang tercantum dalam protokol.

Walapun demikian kami mengingatkan bahwa dalam pelaksanaan penelitian ini, peneliti tetap diminta untuk menjaga dan menghormati martabat manusia yang menjadi responden/informan dalam penelitian ini. Dengan demikian diharapkan masyarakat luas dapat memperoleh manfaat yang baik dari penelitian ini.

Pada akhir penelitian, laporan pelaksanaan penelitian harus diserahkan kepada KEPK-BPPK. Jika ada perubahan protokol dan / atau perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kajian etik penelitian (amandemen protokol).

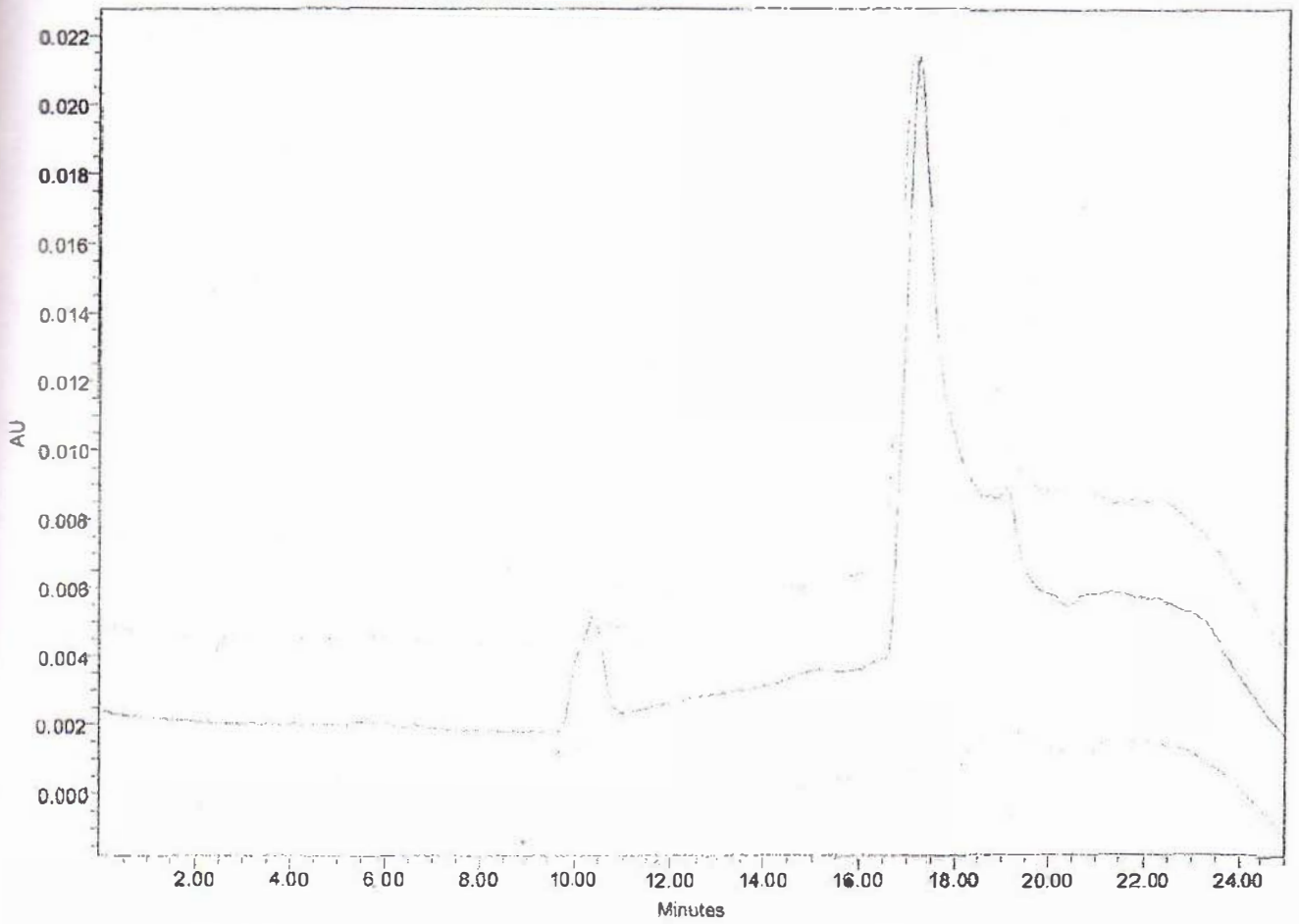
Jakarta, 4 April 2012

Ketua
Komisi Etik Penelitian Kesehatan
Badan Litbang Kesehatan,

Prof. Dr. M. Sudomo

Lampiran 3. Hasil Uji HPLC catechin

Overlay Report

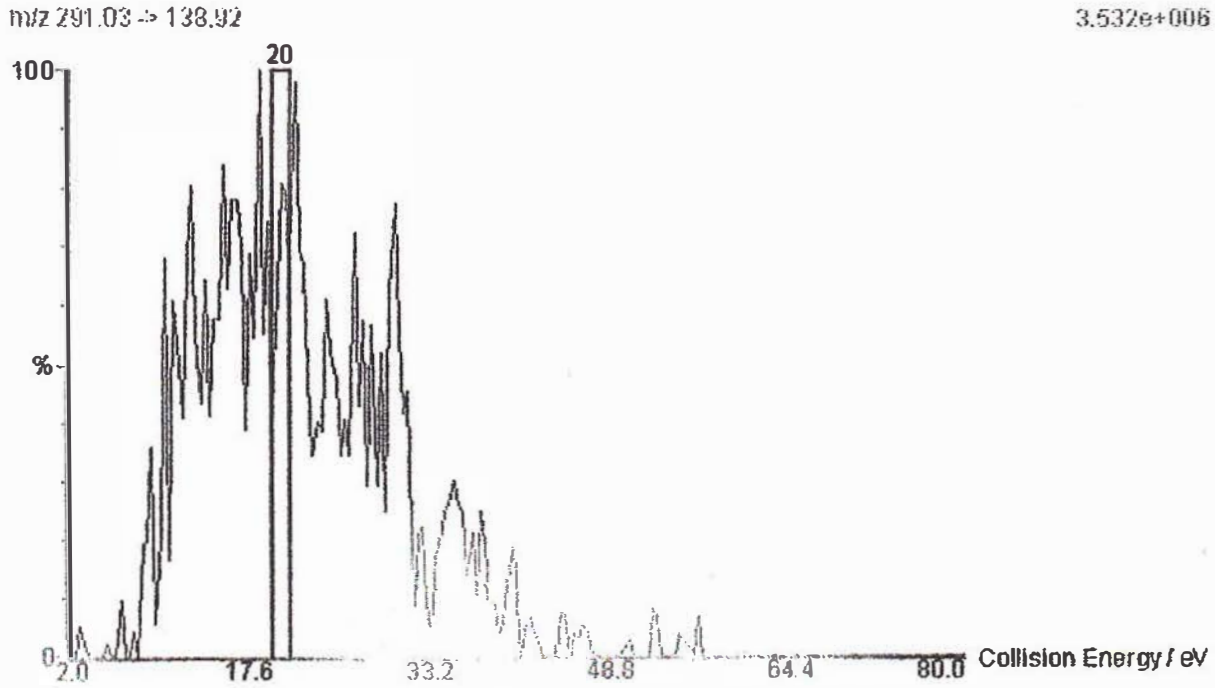


	Blank 160212;	Vial: 1; Inj #: 1; Channel: ****
	std katekin 98;	Vial: 2; Inj #: 1; Channel: ****
———	sampel;	Vial: 3; Inj #: 1; Channel: ****
	sampel;	Vial: 3; Inj #: 2; Channel: ****
	sampel;	Vial: 3; Inj #: 3; Channel: ****
	std katekin 98;	Vial: 2; Inj #: 1; Channel: ****

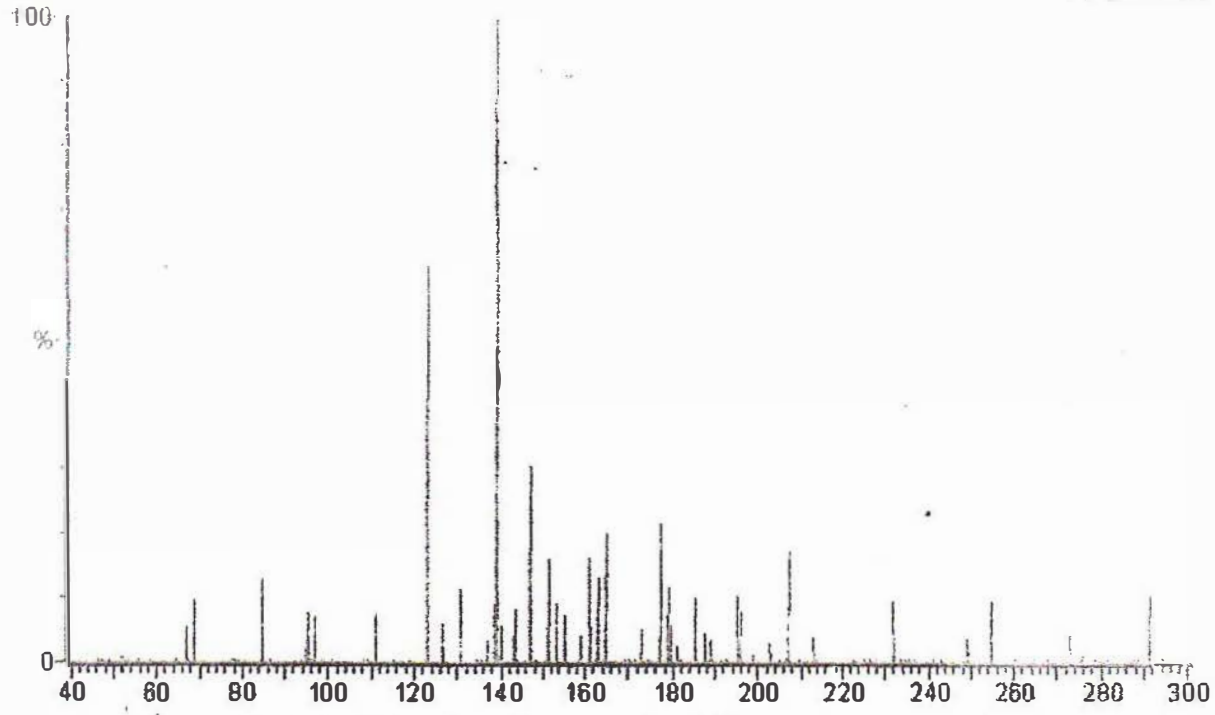
Reported by User: System
Report Method: Overlay Report
Report Method ID: 1008
Page: 1 of 1

Project Name: catechin

Lampiran 4. Hasil Uji LC/MS-MS catechin



Collision Energy Optimization (m/z 291.03 -> 138.92)



Optimized Daughter Spectrum (at Collision Energy 20eV)