

## Deskripsi

### **PENGEMBANGAN PRODUK EKSTRAK BAHAN AKTIF YANG MENGANDUNG SENYAWA OLIGORESVERATROL DARI TUMBUHAN MERANTI SEBAGAI OBAT KANKER**

5

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

Dengan inti temuan :

- a. Pembuatan produk ekstrak bahan aktif yang mengandung senyawa oligoresveratrol dari tumbuhan meranti sebagai obat kanker
- b. Kandungan senyawa oligoresveratrol dalam produk ekstrak yang digunakan sebagai obat kanker
- c. Mekanisme molekuler senyawa oligoresveratrol yang ditemukan dalam produk sebagai obat kanker

15

#### **Latar Belakang Invensi**

Salah satu kelompok tumbuhan tropis yang endemik Indonesia adalah famili Dipterocarpaceae, yang dikenal dengan nama daerah meranti, keruing, atau cengal, dan kadang-kadang disebut sebagai kayu kalimantan. Tumbuhan ini terdiri dari 16 genus dan sekitar 600 spesies (Cronquist, 1981), 9 genus diantaranya terdapat di Indonesia, tersebar mulai dari Aceh sampai Papua dengan populasi terbesar terdapat di Kalimantan. *Hopea* merupakan salah satu genus Dipterocarpaceae yang banyak terdapat di Indonesia, sedikitnya terdiri dari 100 spesies (Heyne, 1987; Sorianegara, 1994).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan terhadap beberapa spesies Dipterocarpaceae dapat diketahui bahwa senyawa kimia yang lazim ditemukan pada tumbuhan ini adalah terpenoid, fenilpropanoid, flavonoid, turunan benzofuran dan asam fenolat, serta oligomer stilbenoid. Telah dilaporkan pula bahwa sejumlah senyawa oligomer stilbenoid memiliki aktivitas biologi yang

30

menarik seperti antitumor, antiinflamasi, antibakteri, sitotoksik, bersifat kemopreventif, hepatoprotektif, dan anti-HIV (Dai, 1998; Seo, 1999; Tanaka, 2000<sup>b</sup>).

Penelusuran terhadap paten-paten internasional seperti Jepang, Eropa, dan Amerika menunjukkan adanya penggunaan ekstrak dan senyawa resveratrol maupun derivatnya untuk pengobatan, seperti pada paten Eropa WO 01/91695 " The use of resveratrol as sunscreen", WO 2004/04 1260 " Use of resveratrol for the preparation of medicament useful for the treatment of influenza virus infection ". Paten Amerika USP 6,638,545 " Food complemen and method for cosmetic based on a grape extract rich in polyphenols", USP 6,680,458 tentang aktivitas resveratrol dan turunannya untuk mengobati penyakit kanker prostat. Demikian pula beberapa produk yang menggunakan resveratrol dan derivatnya sebagai pengobatan penyakit kulit telah dipatenkan oleh Pelliccia, dkk (2001), demikian juga pembuatan ekstrak obat antitumor dari tumbuhan spermatophita yang mengandung resveratrol dan turunannya seperti  $\epsilon$ -viniferin, ampelopsin A, dan hopeafenol telah dipatenkan oleh Ravagnan (2001). Dari hasil-hasil penelitian tersebut dapat diketahui potensi resveratrol dan derivatnya di bidang industri farmasi. Dengan melihat potensi kekayaan alam Indonesia, berupa tumbuhan famili Dipterocarpaceae dengan variasi jumlah spesies yang cukup banyak maka perlu dilakukan penelitian yang terus-menerus dan berkesinambungan untuk mengeksplorasi senyawa-senyawa kimia yang dikandungnya serta menguji aktivitas biologinya.

Ruang lingkup penelitian yang dilakukan meliputi pemisahan senyawa oligoresveratrol yang terdapat pada kulit batang tumbuhan Meranti, seperti *Hopea odorata*, *H. mengarawan*, dan *H. nigra*, melakukan fraksinasi dan identifikasi struktur secara spektroskopi, serta uji sitotoksik sebagai antitumor menggunakan cell lines, yaitu sel *Hela S-3*, sel *Raji*, dan *Meyloma*. Dari

penelusuran literatur, belum pernah ada laporan penelitian sebelumnya yang menggunakan ketiga sel tersebut untuk uji aktivitas senyawa-senyawa oligoresveratrol yang ditemukan pada famili Dipterocarpaceae. *Hela-S3 cell lines* merupakan *culture* 5 *continous* turunan dari *Hela cell lines* dan tumbuh sebagai sel yang semi melekat (*semi adherent*). Sel ini diturunkan dari sel epitel kanker leher rahim (cervix) seorang perempuan berkulit hitam, berumur 31 tahun, sedangkan Raji cell lines diturunkan dari limfoblast seorang laki-laki berkulit hitam, berumur 11 10 tahun dan menderita *Burkitt lymphoma*. Raji merupakan *culture continous* dan bersifat melayang-layang dalam media (ATCC). Sel Myeloma dapat dikultur dalam *cell line* pada manusia dikenal sebagai penyakit *multiple myeloma* (MM) (Pratt, 2002). MM dikarakterisasikan sebagai akumulasi malignan plasma sel yang 15 berpengaruh pada proses *osteoclast* dan *osteoblast* dari tulang yang menyebabkan terjadinya kerusakan tulang.

Isolasi senyawa kimia dari bahan tumbuhan dilakukan dengan cara maserasi secara tuntas dengan pelarut aseton pada suhu kamar selama 3 x 24 jam. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan pada 20 tekanan rendah dan ditambahkan dietil eter untuk menghilangkan tanin. Pemisahan dan pemurnian senyawa kimia dilakukan dengan teknik kromatografi, seperti kromatografi vakum cair (kvc), kromatografi kolom gravitasi (kg), dan kromatografi kolom tekan (kkt), serta kristalisasi untuk senyawa-senyawa yang dapat 25 membentuk kristal. Identifikasi dan elusidasi struktur dilakukan berdasarkan cara yang lazim, dimulai dengan uji kemurnian dengan analisis kromatografi lapis tipis menggunakan beberapa eluen dengan kepolaran berbeda, penentuan titik leleh, dan putaran optik, serta analisis spektrum UV, IR,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, dan MS.

30 Uji sitotoksisitas sebagai antitumor dalam penelitian ini menggunakan beberapa jenis *cell lines* yaitu *raji*, *Hela-S3*, dan *Meyloma* dilakukan dengan urutan sebagai berikut :

1. Menumbuhkan *cell lines* dari penyimpanan dalam nitrogen cair

Sel beku dari nitrogen cair dibiarkan pada suhu kamar sampai mencair sebagian, kemudian dimasukkan dalam tabung konikal 15 ml, dan ditambah 10 ml media pencuci lalu dikocok.

5 Setelah itu disentrifus 750 g selama 7 menit. Pelet diambil ditambahkan dengan media kultur, kemudian sel dimasukkan dalam flask. Semua kegiatan tersebut dilakukan secara aseptis dalam laminar *laminar airflow*. Sel kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C dengan aliran CO<sub>2</sub> 5%. Perkembangan sel diamati tiap hari dan jika  
10 media mulai menguning diganti dengan media baru.

2. Uji sitotoksitas Beberapa senyawa oligoresveratrol hasil isolasi dari tumbuhan meranti

Jika sel sudah tumbuh memenuhi flask, media pada sel *Hela-S3* diambil, dicuci dengan PBS secukupnya. Selanjutnya sel *Hela-S3* dilepas dari dinding flask (*scapper*) menggunakan 0,5 ml  
15 tripsin 0,05%. Flask dikocok perlahan sampai sel terlepas semua. Suspensi sel diinkubasi 2-5 menit di inkubator CO<sub>2</sub> pada 37°C. Selanjutnya suspensi sel tersebut dimasukkan dalam tabung *conical* 15 ml dan ditambahkan dengan media kultur sebanyak 5 ml.  
20 Jumlah sel dihitung dengan *hemocytometer*, di suspensikan dalam media kultur sampai diperoleh kepadatan sel  $2 \times 10^4$ . Sel *raji* tidak perlu *discappeer* karena tidak menempel pada dinding flask tetapi melayang dalam media.

Uji sitotoksitas dilakukan dalam plate 96 sumuran. Sampel  
25 dilarutkan dalam media kultur yang mengandung DMSO 0,05%. Setiap sumuran dimasukkan 100 µl sampel dengan berbagai konsentrasi menggunakan 3 kali ulangan. Sumuran yang tersisa digunakan untuk kontrol positif yang berisi sel tanpa penambahan sampel, dan kontrol negatif hanya mengandung media kultur. Sebagai  
30 pembanding digunakan doksorubisin yang dikenal sebagai obat leuimia akut, limfoma, dan sejumlah timor akut. Selanjutnya diinkubasi 12- 24 jam pada suhu 37°C diinkubator CO<sub>2</sub>. Untuk sel

*HeLa-S3*, media diambil, kemudian masing-masing sumuran ditambahkan 110  $\mu$ l media kultur yang mengandung MTT. Kultur diinkubasi 4 jam pada suhu 37°C di inkubator CO<sub>2</sub>. Selanjutnya ditambahkan 100  $\mu$ l pelarut formazan, di gojog pelahan dengan shaker selama 5 menit. Dilanjutkan dengan inkubasi 12-24 jam pada suhu kamar dalam ruang gelap. Serapan dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm.

### **Ringkasan Penemuan**

- 10 Keunggulan dari penelitian ini adalah :
- a. Pembuatan produk ekstrak bahan aktif yang mengandung senyawa oligoresveratrol dari tumbuhan meranti sebagai obat kanker
  - b. Kandungan senyawa oligoresveratrol dalam produk ekstrak yang digunakan sebagai obat kanker
  - 15 c. Mekanisme molekuler senyawa oligoresveratrol yang ditemukan dalam produk sebagai obat kanker

### **Uraian Gambar**

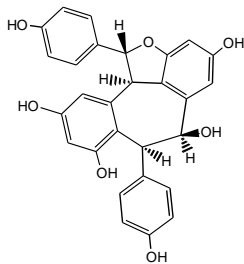
- 20 Tidak ada

### **Uraian Lengkap Penemuan**

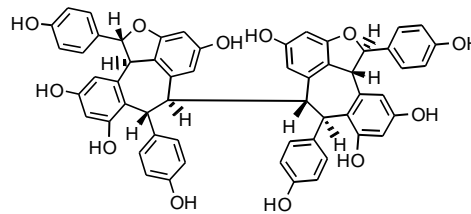
- a. Pembuatan ekstrak tumbuhan meranti dari spesies *Hopea odorata*  
 Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi 3,8 kg serbuk halus kulit batang *H. odorata* ditambahkan aseton sebanyak 10 l dan didiamkan pada suhu kamar selama 24 jam, sambil sesekali diaduk. Maserasi ini diulang sebanyak 3x. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan pada tekanan rendah dan selanjutnya ditambahkan sedikit dietil eter untuk menghilangkan tanin. Tanin yang  
 25 menggumpal dengan dietil eter dipisahkan, fraksi larut
- 30

dikeringkan pada tekanan rendah, sehingga diperoleh padatan berwarna kecoklatan sebanyak 450 gram (rendemen 11,8 %).

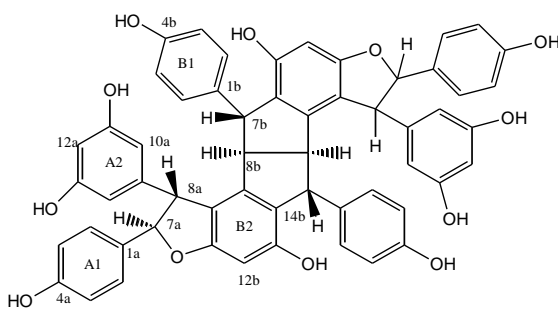
- b. Penemuan struktur senyawa oligoresveratrol dari produk ekstrak *H. odorata* yang memiliki aktivitas sebagai antikanker Hasil identifikasi secara spektroskopi UV, IR, NMR ( $^1\text{H}$  &  $^{13}\text{C}$ ) serta FAB MS dapat diketahui adanya empat senyawa aktif yang terdapat dalam produk ekstrak bahan aktif *H. odorata* yaitu balanokarpol (1), hopeafenol (2), ampelopsin H, dan hemlesyanol C (4) ( Sri Atun, 2005, 2006<sup>a,b</sup>, Nurfina, 2006).



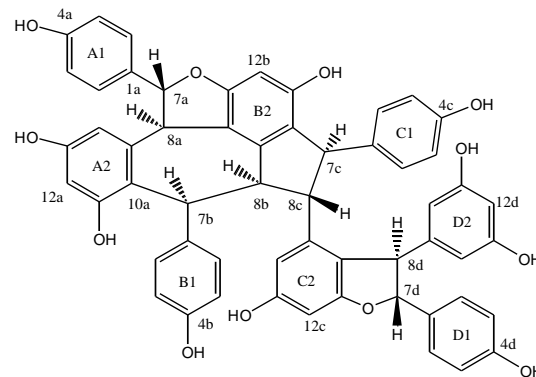
Balanokarpol (1)



Hopeafenol (2)



Ampelopsin H (3)



Hemlesyanol C (4)

Hasil uji sitotoksitas produk ekstrak bahan aktif dari *H. odorata* menunjukkan aktivitas sitotoksik yang aktif terhadap sel *Hela S3* dan sangat aktif terhadap sel *Raji*. Demikian juga beberapa senyawa yang terdapat dalam ekstrak juga menunjukkan adanya beberapa senyawa yang memiliki harga  $LC_{50}$  yang lebih rendah dari doxorobucin (kontrol positif) yang merupakan senyawa bahan obat kanker, sehingga senyawa tersebut menunjukkan aktivitas yang tinggi. Beberapa senyawa yang menunjukkan aktivitas tinggi terhadap sel *Hela S3*, *Raji* maupun *Meyloma*. Balanokarpol (1) menunjukkan aktivitas tinggi terhadap sel *Raji*, ampelopsin H (3) bersifat sitotoksik terhadap sel *Hela S3*, dan *Raji*, demikian juga hemlesyanol C bersifat sitotoksik terhadap sel *Raji*.

Tabel 1. Hasil uji sitotoksitas terhadap sel *Hela S3*, *Raji* dan *Meyloma* dari beberapa oligoresveratrol dari ekstrak *H. odorata*

| No | Senyawa                               | Sel <i>Hela S3</i>            |              | Sel <i>Raji</i>               |              | Sel <i>Meyloma</i>            |              |
|----|---------------------------------------|-------------------------------|--------------|-------------------------------|--------------|-------------------------------|--------------|
|    |                                       | $LC_{50}$<br>$\mu\text{g/mL}$ | Keterangan   | $LC_{50}$<br>$\mu\text{g/mL}$ | Keterangan   | $LC_{50}$<br>$\mu\text{g/mL}$ | Keterangan   |
| 1  | Ekstrak bahan aktif <i>H. odorata</i> | 295,53                        | aktif        | 84,29                         | Sangat aktif | Belum diuji                   | Belum diuji  |
| 1  | Balanokarpol (1)                      | 692,787                       | Kurang aktif | 235,29                        | aktif        | 181,134                       | Kurang aktif |
| 2  | Hopeafenol (2)                        | > 1000                        | Kurang aktif | 781,49                        | Kurang aktif | 236,047                       | Kurang aktif |
| 3  | Ampelopsin H (3)                      | 129,71                        | Aktif        | <b>91,075</b>                 | Sangat aktif | 165,959                       | Kurang aktif |
| 4  | Hemlesyanol C (4)                     | 557,44                        | Kurang aktif | <b>292,14</b>                 | <b>aktif</b> | 756.43                        | Kurang aktif |
| 5  | Doxorobucin (kontrol positif)         | 96,872                        | Aktif        | 242,10                        | Aktif        | 9,0573                        | Sangat aktif |

Penelitian selanjutnya adalah uji aktivitas terhadap sel Vero (sel normal) untuk mengkaji keamanan senyawa-senyawa tersebut apabila digunakan untuk pengobatan kanker. Selain itu juga akan dilakukan uji mekanisme molekuler senyawa oligoresveratrol yang menunjukkan toksisitas yang tinggi baik terhadap sel *Hela S3* maupun Sel *Raji*. Mekanisme molekuler yang akan dikaji antara lain antiproliferasi, apoptosis, dan siklus penghambatan sel.

### 1). Hasil Uji Sitotoksitas terhadap sel Vero

10

Pengujian aktivitas terhadap sel Vero dilakukan pada ampelopsin H (3), terhadap sel Vero menunjukkan harga  $LC_{50}$  305,652  $\mu\text{g/ml}$ , hal ini menunjukkan aktivitas yang kurang aktif. Dengan demikian ampelopsin H (3) relatif aman terhadap sel normal.

15

### 2). Mekanisme molekuler ampelopsin H (3) terhadap sel *Hela S3*

#### a). Uji aktivitas antiproliferasi

Dari data uji sitotoksitas tersebut (Tabel 2) menunjukkan bahwa ampelopsin H (3) memiliki aktivitas yang hampir sama dengan kontrol positif. Uji proliferasi sel dilakukan untuk mengetahui pola hambatan pertumbuhan sel akibat perlakuan senyawa ampelopsin H (3). Pada sel normal proliferasi sel akan seimbang dengan kematian sel terprogram, namun pada sel kanker proliferasi sel berjalan terus menerus. Proliferasi sel ini bisa dihambat dengan pemberian senyawa tertentu atau perlakuan tertentu yang mengakibatkan kematian sel melalui beberapa mekanisme misalnya apoptosis atau nekrosis.

25

Aktivitas antiproliferasi dilakukan dengan menggunakan MTT cell proliferation Kit, secara kolorimetri berdasarkan terbentuknya perubahan warna sel kontrol dan perlakuan. Sel

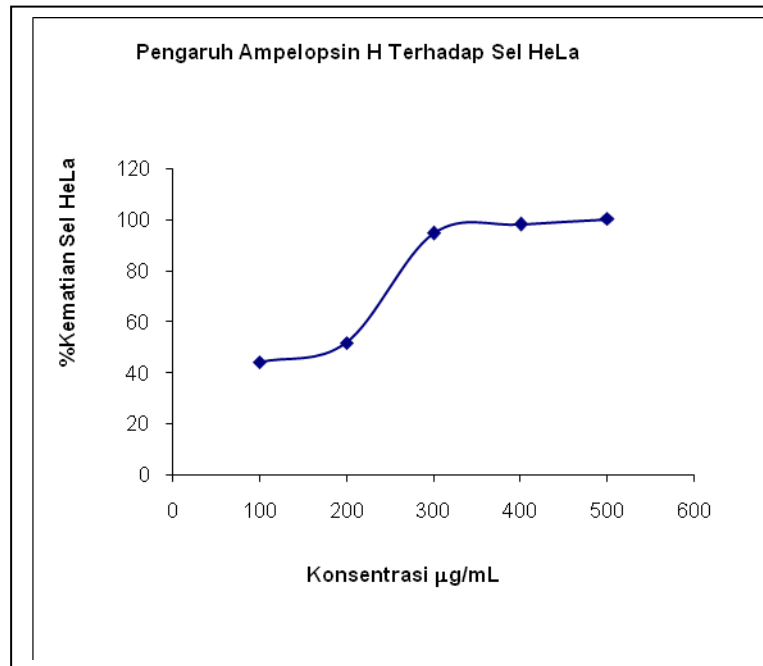
30



ditempatkan dalam plate 96 sumuran. Setelah 24 jam, sel ditambahkan DMSO (0,1-0,3%) sebagai kontrol dan ditambahkan sampel pada berbagai variasi dosis. Setelah diinkubasi selama 48 jam, sel ditambahkan 10  $\mu$ L MTT reagent selama 4 jam pada suhu 37°C dan diencerkan hingga 100  $\mu$ L dan didiamkan selama satu malam. Secara kuantitatif perubahan produk yang dihasilkan diukur menggunakan spektrofotometer microtiter plate reader pada 595 nm. Prosentase pertumbuhan dihitung berdasarkan hasil perbandingan dengan sel kontrol yang hanya ditambahkan DMSO tanpa sampel. Aktivitas antiproliferasi akibat penambahan ampelopsin H (6) pada berbagai konsentrasi terdapat pada Tabel 2, dan dapat digambarkan seperti pada gambar 1.

Tabel 2. Aktivitas antiproliferasi akibat penambahan ampelopsin H (3) pada berbagai konsentrasi

| No | Konsentrasi<br>mg/mL | Absorbansi |        |       | Rata-2<br>Absorbansi | % sel<br>mati | % sel<br>hidup |
|----|----------------------|------------|--------|-------|----------------------|---------------|----------------|
|    |                      | 1          | 2      | 3     |                      |               |                |
| 1  | 500                  | 0.334      | 0.336  | 0.339 | 0.336                | 100.34        | -0.34          |
| 2  | 400                  | 0.313      | 0.322  | 0.424 | 0.353                | 98.21         | 1.79           |
| 3  | 300                  | 0.313*     | 0.314* | 0.38  | 0.380                | 94.77         | 5.23           |
| 4  | 200                  | 1.112      | 0.708  | 0.329 | 0.716                | 51.87         | 48.13          |
| 5  | 100                  | 0.639      | 0.779  | 0.91  | 0.776                | 44.26         | 55.74          |
| 6  | Kontrol<br>Sel       | 1.185      | 1.095  | 1.089 | 1.123                | (A)           |                |
| 7  | Kontrol<br>Media     | 0.331      | 0.336  | 0.35  | 0.339                | (C)           |                |



Gambar 1. Grafik hubungan konsentrasi senyawa ampelopsin H (3) terhadap % kematian sel HeLa S3

### 3). Uji aktivitas siklus penghambatan sel

Uji aktivitas siklus penghambatan sel dilakukan dengan uji *doubling time*. Senyawa yang dapat menunda waktu penggandaan sel, di duga dapat menghambat gen-gen/protein-protein yang meregulasi *cell cycle*. Uji *doubling time* dilakukan dengan menghitung jumlah sel yang diberi perlakuan pada satuan waktu (setiap 24 jam). Jumlah sel dihitung berdasarkan serapan pada panjang gelombang 595 nm. Selanjutnya dibuat kurva jumlah sel versus waktu inkubasi. Perbedaan waktu penggandaan dilihat dari *slope* pada kurva atau dihitung berdasarkan ekstrapolasi (Dotzlaw H., 1997).

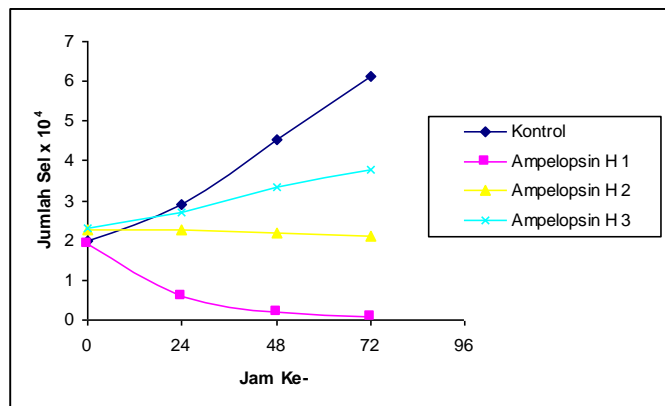
Uji *doubling time* dilakukan pada fraksi ampelopsin H (3) yang memiliki  $LC_{50}$  sebesar 129,718 µg/mL. Uji dilakukan dengan menggunakan variasi konsentrasi ampelopsin H berturut-turut sebesar 135; 67,5 dan 33,75 µg/mL dengan waktu inkubasi 0, 24, 48 dan 72 jam. Uji dilakukan pada konsentrasi disekitar  $LC_{50}$  atau di bawahnya dengan harapan sel tidak banyak yang mengalami

kematian pada pengamatan selama 72 jam akibat sifat senyawa yang diujikan dan profil pertumbuhan sel dapat diamati pada jam ke 24, 48, dan 72. Hasil uji *doubling time* pada sel HeLa S3 tanpa perlakuan (kontrol) dan dengan pemberian ampelopsin H (3) ditunjukkan pada Tabel 3 dan Gambar 2.

Tabel 3. Jumlah sel HeLa S3 pada pengamatan 0, 24, 48, dan 72 tanpa perlakuan (kontrol) dan dengan pemberian ampelopsin H (3)

| Jam   | Kontrol | Kadar Ampelopsin H (3) ( $\mu\text{g/mL}$ ) |      |       |
|---|---------|---|------|-------|
|   |         | 135   | 67,5 | 33,75 |
|   |         | 1   | 2    | 3     |
| <b>JUMLAH SEL RATA-RATA X <math>10^4</math></b> |         |   |      |       |
| 0   | 2,00    | 1,90  | 2,26 | 2,32  |
| 24  | 2,92    | 0,58  | 2,26 | 2,71  |
| 48  | 4,53    | 0,19  | 2,60 | 3,20  |
| 72  | 6,13    | 0,09  | 2,42 | 3,65  |

10



15

Gambar 2. Profil kurva pertumbuhan sel HeLa S3 tanpa perlakuan (kontrol) dan dengan pemberian ampelopsin H (3) pada pengamatan jam ke 24, 48, dan 72 .

20 Gambar 2. menunjukkan bahwa perlakuan dengan ampelopsin H (3) pada konsentrasi 135  $\mu\text{g/mL}$ , 67,5 dan 33,75 dapat menurunkan pertumbuhan sel HeLa-S3 dibandingkan dengan kontrol (tanpa perlakuan). Berdasarkan perhitungan perbedaan waktu penggandaan yang dihitung menggunakan ekstrapolasi, menunjukkan bahwa slope

perlakuan dengan ampelopsin H (3) (Tabel 4) lebih kecil dibandingkan dengan slope tanpa perlakuan (kontrol). Terlihat pula bahwa dengan penambahan ampelopsin H (6) menyebabkan semakin lama waktu penggandaan sel bila di bandingkan dengan kontrol. Dengan demikian dapat dibuktikan bahwa ampelopsin H (3) dapat menyebabkan terjadinya penundaan waktu *doubling time*.

Tabel 4. Persamaan kurva log jumlah sel versus waktu pada sel HeLa S3 pada berbagai perlakuan

| Perlakuan                           | Persamaan garis         | Slope   | Nilai Doubling Time (Jam) |
|-------------------------------------|-------------------------|---------|---------------------------|
| Kontrol                             | $Y = 0,0069X + 4,3048$  | 0,0069  | 43.087                    |
| Ampelopsin H 135 $\mu\text{g/mL}$   | $Y = -0,0186X + 4,2381$ | -       | -                         |
| Ampelopsin H 67,5 $\mu\text{g/mL}$  | $Y = -0,0004X + 4,3571$ | -0.0004 | -                         |
| Ampelopsin H 33,75 $\mu\text{g/mL}$ | $Y = 0,0027X + 4,368$   | 0.0035  | 110.852                   |

10

### 3). Pengamatan apoptosis

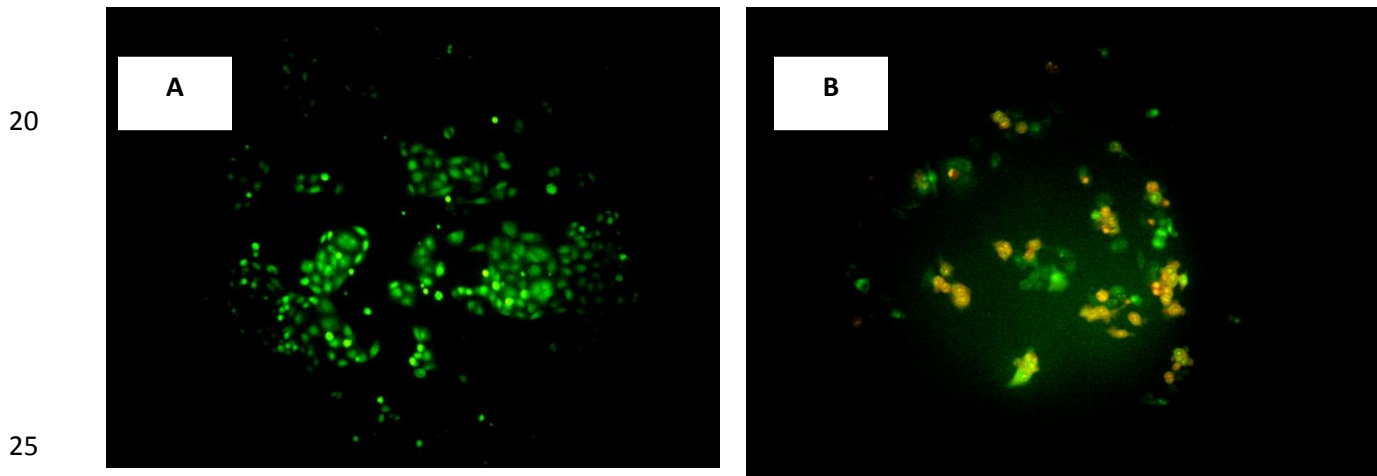
#### a). Metode pengecatan DNA seluler

Pengamatan apoptosis dilakukan dengan menggunakan senyawa fluoresen etidium bromide-akridin orange. Akridin orange akan menembus seluruh bagian sel dan inti sehingga sel hidup akan nampek berfluoresensi hijau. Etidium bromida merupakan senyawa yang dapat berinterkalasi dengan DNA, oleh karena itu etidium bromida hanya dapat berinteraksi dengan sel yang telah mengalami kerusakan membran, sehingga pada sel mati akan berwarna orange. Hasil pengamatan dengan pewarnaan ganda (Gambar 3) menunjukkan bahwa sel HeLa S3 tanpa perlakuan memberikan warna hijau, yang berarti bahwa sel tersebut hidup.

20

Perubahan DNA sel HeLa-S3 terhadap pengaruh pemberian ampelopsin H (6) pada konsentrasi 135  $\mu\text{g/mL}$  ditunjukkan pada

Gambar 6 B. Sel yang hidup, yaitu sel yang mempunyai nukleus utuh berwarna hijau terang (Gambar 3A), sedangkan sel yang sudah mengalami apoptosis berwarna oranye (Gambar 3B). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ampelopsin H (3) menyebabkan sel mengalami apoptosis yang ditunjukkan dengan warna orange, dan karakteristik morfologi, yaitu sel mengecil, membran bleeding, kondensasi kromatin, dan adanya fragmentasi inti. Sel HeLa-S3 bersifat immortal karena adanya ekspresi protein E6 yang mendegradasi p53 dan E7 yang mendegradasi pRb, sehingga sel kehilangan protein pada pertumbuhan sel. Belum ada data yang menunjukkan aktivitas ampelopsin H (3) dapat menekan ekspresi E6 dan E7. Mengacu pada beberapa senyawa yang bersifat sebagai antikanker, seperti kurkumin, aktivitas antiproliferatif dari ampelopsin H (3) kemungkinan diawali dengan pengikatan protein-protein yang diekspresikan sel yang mengakibatkan protein tersebut dikenali oleh proteosome yang selanjutnya mendegradasi protein tersebut.

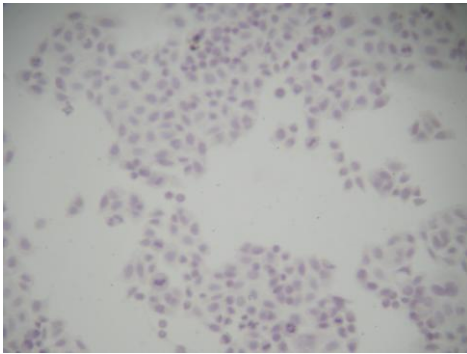


Gambar 3. Hasil pengamatan apoptosis menggunakan pewarnaan etidium bromide-akridin orange : (A). Sel HeLa S3 tanpa perlakuan, dan (B) Sel HeLa S3 dengan penambahan ampelopsin H (3) 135  $\mu\text{g/mL}$

30 **b). Uji immunohistochemical (IHC)**

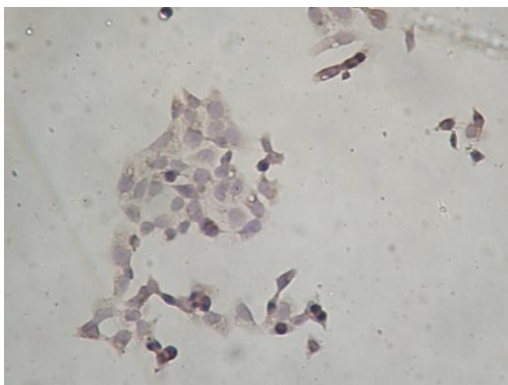
Untuk mengetahui lebih lanjut mekanisme apoptosis dari ampelopsin H (6) terhadap sel HeLa S3 dilakukan dengan melihat pengaruhnya terhadap *p53 tumor suppressor* yang merupakan pengatur proses apoptosis. Resistensi kanker terhadap mekanisme apoptosis diperoleh dengan berbagai macam cara, yang secara umum melibatkan *p53 tumor supresor gene*. Protein p53 mencegah replikasi DNA yang rusak pada sel normal dan mendorong penghancuran sendiri sel yang mengandung DNA yang tidak normal, peristiwa ini disebut apoptosis. Hasil uji IHC ditunjukkan pada Gambar 4 dan Gambar 5.

15



Gambar 4. Hasil IHC pada sel HeLa S3 tanpa pelakuan

20



Gambar 5. Hasil IHC pada sel HeLa S3 dengan penambahan ampelopsin H 135  $\mu\text{g}/\text{mL}$

30

Pada sel HeLa S3 tanpa perlakuan menunjukkan warna biru yang menunjukkan tidak adanya ekspresi protein p53. Hal ini

disebabkan pada sel HeLa terjadi degradasi p53 yang disebabkan adanya ekspresi protein E6, sehingga sel kehilangan protein yang bersifat supresor pada pertumbuhan sel. Pada sel HeLa S3 dengan penambahan ampelopsin H 135  $\mu\text{g}/\text{mL}$  menunjukkan adanya warna merah kecoklatan baik pada nukleus dan sitoplasma, yang berarti adanya ekspresi dari protein p53. Ini menunjukkan bahwa ampelopsin H mampu menekan protein-protein yang mendegradasi protein p53.

#### **d). Mekanisme molekuler ampelopsin H (3) terhadap sel Raji**

##### **10            1). Uji aktivitas antiproliferasi**

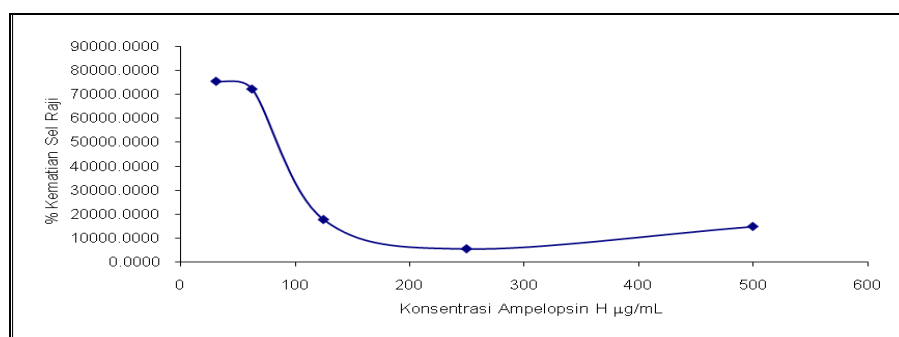
Dari data uji sitotoksitas tersebut (Tabel 1) menunjukkan bahwa ampelopsin H (3) memiliki aktivitas yang lebih besar dengan kontrol positif. Uji antiproliferasi sel dilakukan untuk mengetahui pola hambatan pertumbuhan sel akibat perlakuan senyawa ampelopsin H (6). Pada sel normal proliferasi sel akan seimbang dengan kematian sel terprogram, namun pada sel kanker proliferasi sel berjalan terus menerus. Proliferasi sel ini bisa dihambat dengan pemberian senyawa tertentu atau perlakuan tertentu yang mengakibatkan kematian sel melalui beberapa mekanime misalnya apoptosis atau nekrosis.

Aktivitas antiproliferasi dilakukan dengan menggunakan MTT cell proliferation Kit, secara kolorimetri berdasarkan terbentuknya perubahan warna sel kontrol dan perlakuan. Sel ditempatkan dalam plate 96 sumuran. Setelah 24 jam, sel ditambahkan DMSO (0,1-0,3%) sebagai kontrol dan ditambahkan sampel pada berbagai variasi dosis. Setelah diinkubasi selama 48 jam, sel ditambahkan 10  $\mu\text{L}$  MTT reagent selama 4 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  dan diencerkan hingga 100  $\mu\text{L}$  dan didiamkan selama satu malam. Secara kuantitatif perubahan produk yang dihasilkan diukur menggunakan spektrofotometer microtiter plate reader pada 595 nm. Prosentase pertumbuhan dihitung berdasarkan hasil

perbandingan dengan sel kontrol yang hanya ditambahkan DMSO tanpa sampel. Aktivitas antiproliferasi akibat penambahan ampelopsin H (3) pada berbagai konsentrasi terdapat pada Tabel 5, dan digambarkan seperti pada Gambar 6.

5 Tabel 5. Aktivitas antiproliferasi akibat penambahan ampelopsin H (3) pada berbagai konsentrasi terhadap sel *Raji*

| No | Konsentra-<br>si ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Absorbansi |        |        | Rata-2<br>Serap-<br>an | Jumlah sel | % Kemati-<br>-an<br>Sel |
|----|---------------------------------------|------------|--------|--------|------------------------|------------|-------------------------|
|    |                                       | 1          | 2      | 3      |                        |            |                         |
| 1  | 500                                   | 0.438      | 0.53*  | 0.428  | 0.433                  | 14820.6200 | 82.05                   |
| 2  | 250                                   | 0.371      | 0.339* | 0.388  | 0.380                  | 5503.3090  | 93.33                   |
| 3  | 125                                   | 0.431      | 0.468  | 0.356* | 0.450                  | 17694.1832 | 78.57                   |
| 4  | 62.5                                  | 0.812*     | 0.763  | 0.761  | 0.762                  | 72117.7290 | 12.66                   |
| 5  | 31.25                                 | 0.772      | 0.789  | 0.673* | 0.781                  | 75339.6029 | 8.75                    |
| 6  | K. Sel                                | 0.648*     | 0.751* | 0.822  | 0.822                  | 82567.0498 |                         |
| 7  | K. Media                              | 0.266      | 0.276  | 0.314* | 0.271                  |            |                         |



10 Gambar 6. Grafik hubungan konsentrasi senyawa ampelopsin H (3) terhadap % kematian sel *Raji*

## 2). Pengamatan apoptosis

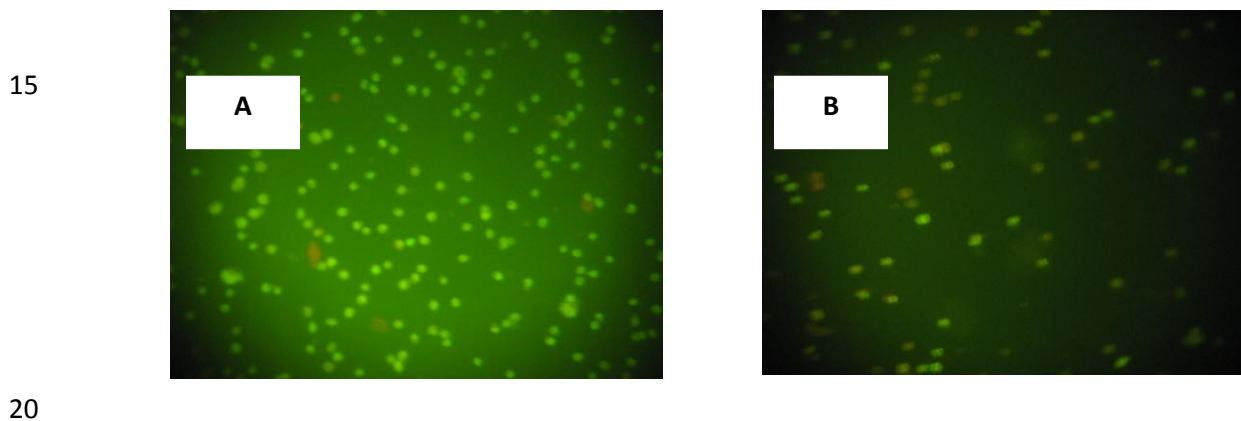
### a) Pengamatan apoptosis dengan pewarnaan senyawa fluoresen

15 Pengamatan apoptosis dilakukan dengan menggunakan senyawa fluoresen etidium bromide-akridin orange. Akridin orange akan menembus seluruh bagian sel dan inti sehingga sel hidup akan nampak berfluoresensi hijau. Etidium bromida merupakan senyawa



yang dapat berinterkalasi dengan DNA, oleh karena itu etidium bromida hanya dapat berinteraksi dengan sel yang telah mengalami kerusakan membran, sehingga pada sel mati akan berwarna orange. Hasil pengamatan dengan pewarnaan ganda (Gambar 10) menunjukkan bahwa sel *Raji* tanpa perlakuan memberikan warna hijau, yang berarti bahwa sel tersebut hidup.

Perubahan DNA sel *Raji* terhadap pengaruh pemberian ampelopsin H (3) pada konsentrasi 34,69 µg/mL ditunjukkan pada Gambar 7 B. Sel yang hidup, yaitu sel yang mempunyai nukleus utuh berwarna hijau terang (Gambar 7A), sedangkan sel yang sudah mengalami kerusakan membran berwarna orange (Gambar 7B). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ampelopsin H (3) menyebabkan sel mengalami apoptosis yang ditunjukkan dengan warna orange.

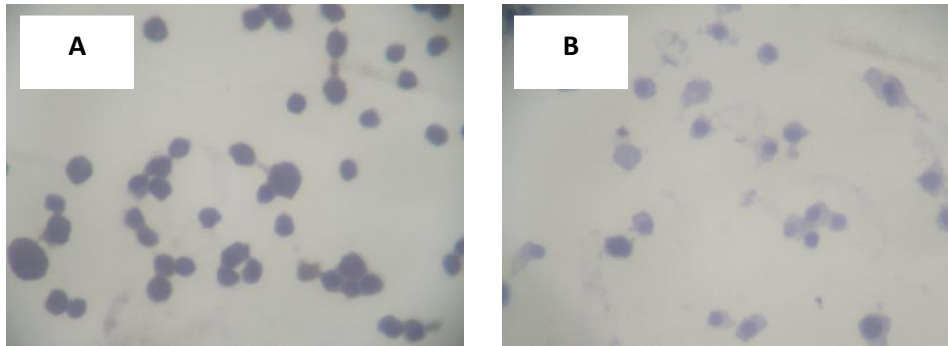


Gambar 7. Hasil pengamatan apoptosis menggunakan pewarnaan etidium bromide-akridin orange : (A). Sel *Raji* tanpa perlakuan, dan (B) Sel *Raji* dengan penambahan ampelopsin H (3) 34,69 µg/mL

25 **b) Pengamatan apoptosis secara uji *immunohistochemical* (IHC)**

Untuk mengetahui lebih lanjut mekanisme apoptosis dari ampelopsin H (3) terhadap sel *Raji* dilakukan dengan melihat

pengaruhnya terhadap *Bcl-2* yang merupakan pengatur proses apoptosis. Hasil uji *IHC* ditunjukkan pada Gambar 8 .



Gambar 8. Hasil *IHC* pada sel Raji tanpa perlakuan (A) dan hasil *IHC* pada sel Raji dengan penambahan ampelopsin H (3) 34,69  $\mu\text{g/mL}$

### c). Uji aktivitas siklus penghambatan sel

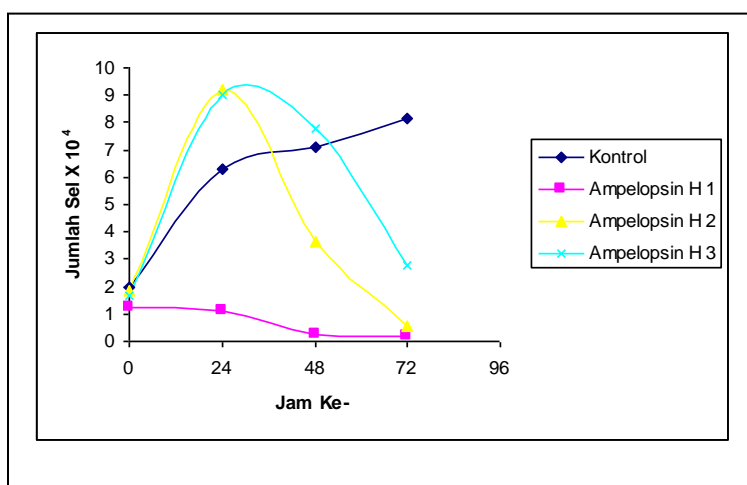
Analisis penghambatan proliferasi sel dilakukan dengan uji *doubling time*. Senyawa yang dapat menunda waktu penggandaan sel, di duga dapat menghambat gen-gen/protein-protein yang meregulasi *cell cycle*. Uji *doubling time* dilakukan dengan menghitung jumlah sel yang diberi perlakuan pada satuan waktu (setiap 24 jam). Jumlah sel dihitung berdasarkan serapan pada panjang gelombang 595 nm. Selanjutnya dibuat kurva jumlah sel versus waktu inkubasi. Perbedaan waktu penggandaan dilihat dari *slope* pada kurva atau dihitung berdasarkan ekstrapolasi.

Uji *doubling time* dilakukan pada fraksi ampelopsin H (3) terhadap sel *Raji* yang memiliki harga  $LC_{50}$  sebesar 34,69  $\mu\text{g/mL}$ . Uji dilakukan dengan menggunakan variasi konsentrasi ampelopsin H berturut-turut sebesar 90; 45 dan 22,5  $\mu\text{g/mL}$  dengan waktu inkubasi 0, 24, 48 dan 72 jam. Hasil uji *doubling time* pada sel *Raji* tanpa perlakuan (kontrol) dan dengan pemberian ampelopsin H (6) ditunjukkan pada Tabel 6 dan Gambar 9.

Tabel 6. Jumlah sel *Raji* pada pengamatan 0, 24, 48, dan 72 tanpa perlakuan (kontrol) dan dengan pemberian ampelopsin H (3)

| Jam                                | Kontrol | Kadar Ampelopsin H (3)<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) |      |      |
|------------------------------------|---------|--|------|------|
|                                    |         | 90   | 45   | 22.5 |
|                                    |         | 1  | 2    | 3    |
| JUMLAH SEL RATA-RATA $\times 10^4$ |         |  |      |      |
| 0                                  | 2.00    | 1.25   | 1.86 | 1.66 |
| 24                                 | 6.33    | 1.09   | 9.18 | 9.00 |
| 48                                 | 7.08    | 0.22   | 3.62 | 7.76 |
| 72                                 | 8.18    | 0.21   | 0.54 | 2.80 |

5



- 10 Gambar 9. Profil kurva pertumbuhan sel Raji tanpa perlakuan (kontrol) dan dengan pemberian ampelopsin H (3) ( $90 \mu\text{g/mL}$ ), ampelopsin H (6) ( $45 \mu\text{g/mL}$ ), dan ampelopsin H (3) ( $22,5 \mu\text{g/mL}$ ) pada pengamatan jam ke 24, 48, dan 72 .

15 Gambar 9 menunjukkan bahwa perlakuan dengan ampelopsin H (3) terhadap sel Raji pada konsentrasi 90 ; 45, dan  $22,5 \mu\text{g/mL}$  dapat menurunkan pertumbuhan sel Raji dibandingkan dengan kontrol (tanpa perlakuan). Berdasarkan perhitungan perbedaan waktu penggandaan yang dihitung menggunakan ekstrapolasi menunjukkan bahwa slope perlakuan dengan ampelopsin H (3)

20 (Tabel 6) lebih kecil dibandingkan dengan slope tanpa perlakuan (kontrol), sehingga menyebabkan nilai *doubling time*-nya semakin besar.

Berdasarkan data nilai *slope* yang lebih kecil dan data nilai *doubling time* tersebut terbukti bahwa ampelopsin H (3) mampu

menghambat proliferasi sel Raji dibandingkan dengan sel kontrol melalui penghambatan sinyal transduksi, *cell cycle progression*, dan kemungkinan pemacuan apoptosis.

5

Tabel 7. Persamaan kurva log jumlah sel versus waktu pada sel Raji pada berbagai Perlakuan

| Perlakuan                                 | Persamaan garis         | Slope  | Nilai Doubling Time (Jam) |
|---|-------------------------|--------|---------------------------|
| Kontrol                                   | $Y = 0,0078X + 4,4337$  | 0.0078 | 21.577                    |
| Ampelopsin H 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$   | $Y = -0,0127X + 4,1532$ | 0,0127 | - *)                      |
| Ampelopsin H 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$   | $Y = -0,0084X + 4,6828$ | 0.0084 | -*)                       |
| Ampelopsin H 22.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | $Y = 0,0026X + 4.5345$  | 0.0026 | -*)                       |

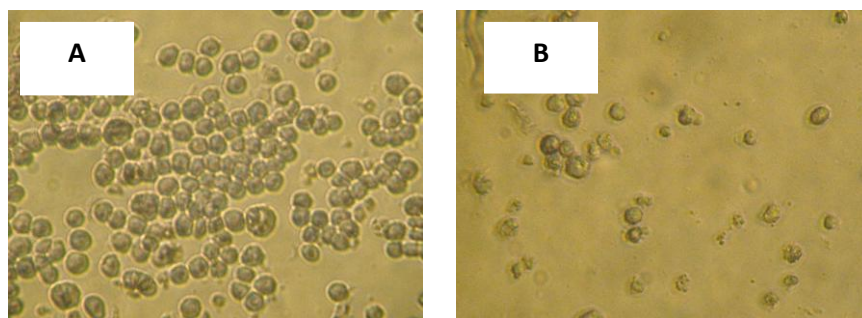
\*) tidak dapat dihitung, karena slopenya negatif atau sangat kecil

10

### e). Mekanisme molekuler Ampelopsin H (3) pada Sel Myeloma

#### 1). Uji Sitotoksisitas Terhadap Sel Myeloma

15



20 Gambar 10. Hasil pengamatan uji sitotoksisitas (A). Sel Myeloma tanpa perlakuan, dan (B) Sel Myeloma dengan penambahan Ampelopsin H 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$

#### 2). Analisis Doubling Time Terhadap Sel Myeloma

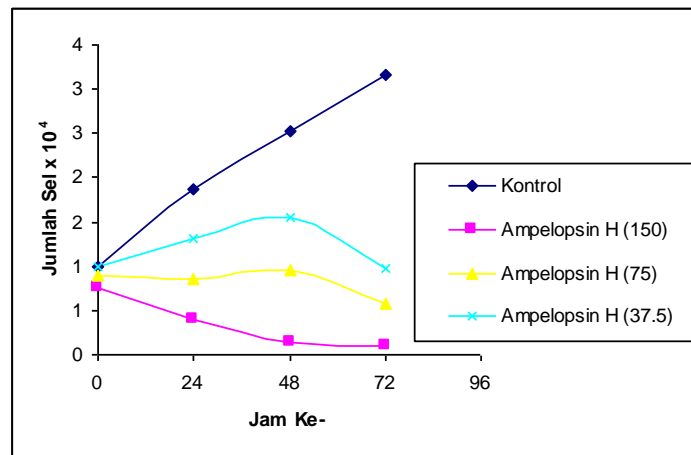
25 Uji doubling time dilakukan pada sampel Ampelopsin H ( $\text{LC}_{50}$  sebesar 165,959  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) dengan menggunakan variasi konsentrasi berturut-turut sebesar 150; 75 dan 37,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dengan waktu

inkubasi 0, 24, 48 dan 72 jam. Hasil uji *doubling time* pada sel Myeloma tanpa perlakuan (kontrol) dan dengan pemberian ampelopsin H ditunjukkan pada Tabel 10 dan Gambar 14.

5 Tabel 8. Jumlah sel Myeloma pada pengamatan 0, 24, 48, dan 72 tanpa perlakuan (kontrol) dan dengan pemberian ampelopsin H

| Jam                                    | Kontrol | Kadar Ampeopsin H (µg/mL) |      |      |
|--|---------|---------------------------|------|------|
|  |         | 150                       | 75   | 37.5 |
|  |         | 1                         | 2    | 3    |
| JUMLAH SEL RATA-RATA X 10 <sup>4</sup> |         |                           |      |      |
| 0                                      | 1.00    | 0.76                      | 0.89 | 0.99 |
| 24                                     | 1.87    | 0.40                      | 0.86 | 1.32 |
| 48                                     | 2.53    | 0.15                      | 0.96 | 1.56 |
| 72                                     | 3.15    | 0.09                      | 0.57 | 0.98 |

10



15 Gambar 11. Profil kurva pertumbuhan sel Myeloma tanpa perlakuan (kontrol) dan dengan pemberian vatikanol B pada pengamatan jam ke 24, 48, dan 72 .

20

Tabel 9. Persamaan kurva log jumlah sel versus waktu pada sel Myeloma pada berbagai perlakuan dengan penambahan ampelopsin H

| Perlakuan                          | Persamaan garis         | Slope   | Nilai Doubling Time (Jam) |
|------------------------------------|-------------------------|---------|---------------------------|
| Kontrol                            | $y = 0.0068x + 4.0498$  | 0.0068  | 36.946                    |
| Ampelopsin H 150 $\mu\text{g/mL}$  | $y = -0.0132x + 3.8796$ | -0.0132 | -                         |
| Ampelopsin H 75 $\mu\text{g/mL}$   | $y = -0.0023x + 3.9879$ | -0.0023 | -                         |
| Ampelopsin H 37.5 $\mu\text{g/mL}$ | $y = 0.0003x + 4.065$   | 0.0029  | 768.087                   |

5        Tabel 11, menunjukkan nilai *doubling time* yang semakin lama akibat penambahan ampelopsin H menyebabkan semakin lama waktu penggandaan sel bila di dibandingkan dengan kontrol. Dengan demikian dapat dibuktikan bahwa ampelopsin H dapat menyebabkan terjadinya penundaan waktu *doubling time*.

10

15

20

**Klaim**

- 5 a. Pembuatan produk ekstrak bahan aktif yang mengandung senyawa oligoresveratrol dari tumbuhan meranti sebagai obat kanker
- b. Kandungan senyawa oligoresveratrol dalam produk ekstrak yang digunakan sebagai obat kanker
- 10 c. Mekanisme molekuler senyawa oligoresveratrol yang ditemukan dalam produk sebagai obat kanker
- 15
- 20
- 25
- 30

### Abstrak

Telah dilakukan penelitian pembuatan produk ekstrak bahan aktif dari tumbuhan *H. odorata* (meranti) yang dapat digunakan sebagai obat kanker. Uji sitotoksitas ekstrak bahan aktif *H. odorata* terhadap sel *Hela-S3* menunjukkan  $LC_{50}$  295,53  $\mu\text{g/ml}$  (aktif) dan  $LC_{50}$  84,29  $\mu\text{g/ml}$  (sangat aktif) terhadap sel *Raji*. Kandungan senyawa oligoresvertrol dalam ekstrak bahan aktif dari *H. odorata* yaitu balanokarpol (1), hopeafenol (2), ampelopsin H (3), dan hemlesyanol C (4). Beberapa senyawa yang menunjukkan aktivitas tinggi terhadap sel *Hela S3* yaitu ampelopsin H (3), sedangkan yang menunjukkan aktivitas tinggi terhadap sel *Raji* adalah balanokarpol (1), ampelopsin H (3), dan hemlesyanol C (4). Pengujian aktivitas ampelopsin H (3) terhadap sel Vero menunjukkan harga  $LC_{50}$  305,652  $\mu\text{g/ml}$ , hal ini menunjukkan senyawa tersebut relatif aman untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai obat kanker. Mekanisme molekuler dengan uji antiproliferatif menggunakan ampelopsin H (3) pada berbagai konsentrasi menunjukkan makin besar konsentrasinya makin banyak sel *Hela S3*, dan sel *Raji* yang mati, demikian juga uji siklus penghambatan sel menunjukkan bahwa ampelopsin H (3) dapat menyebabkan terjadinya penundaan waktu *doubling time*. Ampelopsin H (3) juga menunjukkan mekanisme apoptosis dengan menekan protein-protein yang mendegradasi protein p53 yang merupakan suppressor kematian sel. Dengan demikian ekstrak bahan aktif yang mengandung senyawa oligoresveratrol, tersebut apabila akan dikembangkan sebagai obat kanker relatif aman.



## Daftar Pustaka

- Cronquist A. (1981). *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*, Columbia In Press, New York, 316 - 318
- 5 Dai, J.R., Y.F Hallock., J.H. Cardellina , M.R. Boyd (1998), HIV-Inhibitory and cytotoxic oligostilbenoids isolated from the leaves of *Hopea malibato*, *J. Nat. Prod.*,. **61**, 351-353
- 10 Hakim E. H. (2002), Oligostilbenoid dari tumbuh-tumbuhan Dipterocarpaceae, *Bull.. Soc. Nat. Prod. Chem. (Indonesia)*, **2** (1), 1 - 9
- Heyne K. (1987), *Tumbuhan berguna Indonesia*, Badan Litbang  
15 Kehutanan, Jakarta, jilid III, 1390 - 1443
- Ito, T, T. Tanaka, Y. Ido; K. Nakaya, M. Linuma, S. Riswan (2000<sup>a</sup>), Stilbenoids isolated from stem bark of *Shorea hemsleyana*, *Chem. Pharm. Bull.* **48** (7), 1001-1005
- 20 Ito T., T. Tanaka, Y. Ido, K. Nakaya, M. Iinuma, S. Riswan (2000<sup>b</sup>), Four new stilbene C-glycosides isolated from the stem bark of *Shorea hemsleyana*, *Chem. Pharm. Bull.* **48** (12), 1959-1963
- 25 Ito T., T. Tanaka, K. Nakaya, M. Iinuma, Y. Takahashi, H. Naganawa, M. Ohyama, Y. Nakanishi, K.F. Bastow, Kuo-Hsing Lee (2001<sup>a</sup>), A new resveratrol octamer, vateriaphenol A, in *Vateria indica*, *Tetrahedron Letters*, **42**, 5909-5912
- 30 Ito T., T. Tanaka, Y. Ido; K. Nakaya, M. Iinuma, Y. Takashi, H. Naganawa, M. Ohyama, Y. Nakanishi, K.F. Bastow, K.H. Lee (2001<sup>b</sup>), A novel bridged stilbenoid trimer and four highly condensed stilbenoid oligomers in *Vatica rassak* , *Tetrahedron*,  
35 **57**, 7309-7314
- Jang M., Lining Cai, G.O. Udeani, K.V. Slowing, C. F. Thomas, C.W.W. Beecher, H.S. Fong, N.R. Farnsworth, A. D. Kinghorn, R.G. Mehta, R.C. Moon, J.M. Pezzuto (1997), Cancer chemopreventive  
40 activity of resveratrol, a natural product derived from *Grapes*, *Science*, **275**, 218- 220

- Langcake P., R.J. Pryce (1977), The production of resveratrol and the viniferins by *Grapevines* in response to ultraviolet irradiation, *Phytochemistry*, **16**, 1193 -1196
- 5 Newman M.F., P.F. Burgess, T.C. Whitmore (1999), *Pedoman Identifikasi Pohon-Pohon Dipterocarpaceae*, Prosea Indonesia, Bogor
- Oshima Y. & Yuji Ueno (1993), Ampelopsin D,E,H, and cis  
10 ampelopsin E, oligostilbenes from *Ampelopsis brevipedunculata* Var.Hancei Roots, *Phytochemistry*, Vol.33, No. 1, 179-182.
- Pelliccia M.T., Giannella A., Giannella J., (2001), Reaveratrol for the treatment of exfoliative eczema, acne or psoriasis, *Eur. Pat. Appl.*, 5 pp. CODEN : EPXXDWEP 1138323 A2 20011004  
15
- Pryce R.J, P. Langcake (1977), (-)- $\alpha$ -Viniferin : an antifungal resveratrol trimer from *Grapevines*, *Phytochemistry*, **16**, 1452-1454  
20
- Ravagnan G., Falchetti R., Lanzilli G., Fuggetta M.P., Tricarico M., Mattivi F., (2001), Method for extraction of antitumor drugs from spermatophyte plants, *PCT Int. Appl.* 38 pp CODEN : PIXXD2 WO 0191763 A2 20011206  
25
- Seo E.K., H. Chai ,H.L. Constant, V.R. Santisuk, R. Vichai, W.W. Christopher , N.R. Farnsworth , G.A. Cordell, J.M. Pezzuto, A.D. Kinghron (1999), Resveratrol tetramer from *Vatica diospyroides*, *J. Org. Chem.* , **64**, 6976-6983  
30
- Soerianegara I., R.H.M.J. Lemmens, (1994), *Plant resources of South East Asia*, 5 (1), *timber trees : major commercial timbers*, Prosea, Bogor, Indonesia, 166- 193
- 35 Sotheeswaran S., V. Pasuphaty (1993), Distribution of resveratrol oligomers in plants, *Phytochemistry*, **32** (5), 1083-1092
- Sri Atun., S. A. Achmad, E. H. Hakim, Y. M. Syah, K. Takeya,  
40 L.D. Juliawaty (2002<sup>a</sup>), Beberapa dimer dan tetramer stilbenoid dari kulit batang *Vatica pauciflora* Blume (Dipterocarpaceae), *Prosiding Seminar Nasional Kimia*, Bandung, hal. 129-135

- 5 Sri Atun., S. A. Achmad, E. H. Hakim, Y. M. Syah, E. L. Ghisalberti, L.D. Juliawaty (2002<sup>b</sup>), Stenofilol B dan hopeafenol, dua oligomer stilbenoid dari kayu batang *Vatica umbonata* Korth (Dipterocarpaceae), *Seminar MIPA III*, ITB, Bandung
- 10 Sri Atun, S. A. Achmad, E. H. Hakim, Y. M. Syah, E. L. Ghisalberti, L.D. Juliawaty, Makmur, L (2004), Oligoresveratrol from *Vatica umbonata*, *Biochem.system. Ecol*, 32(11), 1051-1053.
- 15 Sri Atun (2004), Fitokimia beberapa spesies Dipterocarpaceae Indonesia dari genus *Vatica*, *Hopea*, *Anisoptera*, dan *Dipterocarpus*, Penelitian Disertasi, FPS, Institut Teknologi Bandung.
- 20 Tanaka T., T. Ito, Y. Ido, T.K. Son, K. Nakaya, M. Linuma, M. Ohyama, V. Chelladurai, (2000<sup>a</sup>) Stilbenoids in the stem bark of *Hopea parviflora*, *Phytochemistry*, **53** (8), 1015 -1019
- 25 Tanaka T., T. Ito, K. Nakaya, M. Linuma, S. Riswan (2000<sup>b</sup>), Oligostilbenoids in the stem bark of *Vatica rassak*, *Phytochemistry*, **54**, 63-69
- 30 Tanaka T., T. Ito, K. Nakaya, M. Iinuma, Y. Takashi, H. Naganawa, N. Matsuura, M. Ubukata (2000<sup>c</sup>), Vantikanol D, a novel resveratrol hexamer isolated from *Vatica rassak*, *Tetrahedron Letters*, **41**, 7929 - 7932
- 35 Tanaka T., T. Ito, K. Nakaya, M. Iinuma, Y. Takashi, H. Naganawa, N. Riswan S (2001), Six new heterocyclic stilbene oligomers from stem bark of *Shorea hemsleyana*, *Heterocycles*, 55,4, 729-740.
- 40