

**ISOLASI SENYAWA TURUNAN NAPTOKUINON DARI KULIT BATANG
FALOAK (*Sterculia quadrifida* R.Br) DAN UJI AKTIVITAS ANTIKANKER PADA
SEL KANKER PAYUDARA JENIS T47D**

Rollando Rollando^{1*}, Rokiy Alfanaar²

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Ma Chung, Malang, Indonesia

²Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Ma Chung, Malang, Indonesia

*E-mail: ro.llando@machung.ac.id

ABSTRAK: Faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) digunakan secara empiris oleh penduduk Nusa Tenggara Timur untuk mengobati hepatitis, tifus, maag, dan pemulihan stamina. Informasi senyawa aktif yang terkandung didalam kulit faloak secara spesifik belum dipublikasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui senyawa aktif yang terdapat didalam kulit faloak sebagai antikanker. Ekstraksi menggunakan metode maserasi, isolasi menggunakan metode isolasi bertingkat, elusidasi menggunakan penggabungan informasi dari spektra IR, 1D-NMR, 2D-NMR dan LC-MS, dan uji aktivitas antikanker pada sel kanker payudara T47D menggunakan metode MTT. Hasil isolasi diperoleh isolat turunan senyawa naptokuinon yaitu *2,3-dihydro-6-hydroxy-2-methylenaphtho[1,2-b]furan-4,5-dione* yang aktif sebagai antikanker dengan nilai IC₅₀ pada sel kanker payudara sebesar 9,88 µg/mL dan dengan nilai selektivitas indeks sebesar 30,23.

Kata kunci: Falaok, sitotoksik, *2,3-dihydro-6-hydroxy-2-methylenaphtho[1,2-b]furan-4,5-dione*, T47D.

ABSTRACT: Faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) is used empirically by residents of East Nusa Tenggara to treat hepatitis, typhoid, ulcers, and stamina restorers. The information of the active compounds contained in the faloak skin is not specifically published. This study aims to determine the active compounds contained in the bark of faloak as anticancer. The extraction was conducted with maceration method followed by a multilevel isolation method. The elucidation was carried out using information of IR spectra, 1D-NMR, 2D-NMR and LC-MS. The anticancer activity test on T47D breast cancer cells was also conducted using MTT method. Based on the results obtained, the active compound is naphthoquinone derivative compound which is *2,3-dihydro-6-hydroxy-2-methylenaphtho [1,2-b] furan-4,5-dione* that has anticancer activity on breast cancer cell (T47D) with IC₅₀ value of 9.88 µg/mL and index selectivity value of 30.23.

Keywords: Falaok, cytotoxic, *2,3-dihydro-6-hydroxy-2-methylenaphtho[1,2-b] furan-4,5-dione*, T47D.

1. PENDAHULUAN

Faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) adalah tumbuhan dari famili *Sterculiaceae* yang secara empiris di manfaatkan oleh

masyarakat didaerah Nusa Tenggara Timur (NTT) sebagai tanaman obat tradisional. Masyarakat NTT mengonsumsi air rebusan bagian kulit dari batang tumbuhan faloak

untuk menyembuhkan penyakit hepatitis, gastroenteritis, diabetes dan rheumatoid arthritis [1]. Uji golongan senyawa kimia diperoleh informasi bahwa ekstrak aseton, etil asetat, metanol, dan n-heksana dari kulit batang tumbuhan faloak memiliki senyawa flavonoid, fenolik, tanin dan terpenoid [1]. Rollando dan Prilianti melaporkan bahwa fraksi etil asetat dari kulit batang faloak mampu menginduksi apoptosis dan siklus sel pada sel kanker payudara jenis T47D [2].

Kanker merupakan penyebab kematian utama di dunia, yaitu 7,6 juta kematian (sekitar 13% seluruh kematian) pada tahun 2008 dan diperkirakan semakin meningkat hingga mencapai 13,1 juta kematian pada tahun 2030 [3]. Kanker payudara menduduki peringkat pertama kasus kanker pada wanita di seluruh dunia, dengan angka kejadian sebesar 1.676.633. Kanker ini merupakan penyebab kematian akibat kanker yang paling banyak pada wanita [4]. Salah satu permasalahan yang sering timbul dalam pengobatan kanker adalah resistensi obat kemoterapi (*drug resistance*) [4]. Informasi mengenai senyawa kimia di dalam kulit batang faloak yang mempunyai aktivitas antikanker masih belum banyak di eksplorasi sehingga tujuan dalam penelitian ini adalah untuk mengetahui isolat aktif pada kulit batang faloak yang mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D.

2. PERCOBAAN

Bahan dan Peralatan

Kulit batang faloak, aquadest, etanol (teknis), metanol (Merck), n-heksana (Merck), n-butanol (Merck), etil asetat (Merck), buffer fosfat (Merck), potasium ferrisianida (Merck), FeCl₃ (Merck), Kultur sel T47D, kultur sel Vero, media kultur RPMI (Sigma), FBS 10% (Gibco), penisilin-streptomisin 1% (Gibco), fungizon 0,5% (Gibco), natrium bikarbonat (sigma), hepes (Sigma), tripsin-EDTA 0,25% (Gibco), media M119, reagen MTT [3-(4,5-dimetil thiazol-2-il)-2,5-difeniltetra-

zolium bromide], *phosphate buffer saline* (PBS), reagen stopper (10% (w/v) sodium dodesil sulfat (SDS) dalam 0,1 N HCL, *Phosphate Buffer Saline* (PBS) PH 7,4.

Kolom kromatografi, chamber (sigma), *vacuum rotary evaporator* (Junke & Kunkel), *inverted microscope*, *elisa reader*, vortex (junke & kunkel), *waterbath* (labotech, Heraceus), hemositometer, *cell counter*, filter polietilensulfon, *tissue culture flask*, tabung ependorf, autoklaf (AC-300AE, Tiyoda Manufacturing Co. Ltd), kotak aseptis, cawan petri (Pyrex), ose, plug, *paper disc*, *microtiter plate 96-well* (Bio-Rad), inkubator (Sakura), oven, Erlenmeyer (Pyrex), plat KLT (Merck), chamber KLT (Camag), *Laminar Air Flow cabinet* (FARRco), MS (Mariner Biospectrometry Sistem HRESIMS) dan spektrometer NMR (Delta 2 400 MHz untuk ¹H-NMR dan 100 MHz untuk ¹³C-NMR).

Metode Ekstraksi

Kulit batang faloak sebanyak 2 Kg yang telah kering kemudian diserbuk menggunakan grinder dan diayak menggunakan ayakan 40 mesh dan diperoleh serbuk kulit batang faloak sebanyak 1,50 Kg. Langkah kedua adalah melakukan maserasi selama 48 jam dengan menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:6. Dilakukan pergantian pelarut etanol 96% sebanyak 3 kali. Filtrat diperoleh dengan cara disaring dengan corong Buchner. Seluruh filtrat yang diperoleh diuapkan penyarinya hingga kental dengan evaporator. Bobot ekstrak yang diperoleh adalah 60,76 g atau rendemen yang diperoleh sebesar 4,05 %.

Fraksinasi dan isolasi

Larutan ekstrak difraksinasi menggunakan n-heksana (3x100 mL), etil asetat (3x100 mL), dan n-butanol (3x100 mL) secara berurutan. Masing-masing fraksi dikeringkan pada suhu 40 °C hingga diperoleh bobot fraksi yang tetap. Fraksi etil asetat (25,3g) digunakan untuk dilakukan pemisahan menggunakan metode

Tabel 1. Data NMR (400 MHz, CDCl₃) Senyawa 1

Posisi	C, tipe	H, (J;Hz)	HMBC
1	184.1, C		
2	174.1, C		
3	122.7, C		
4	165.1, C		
5	117.9, CH	7.32 dd (7.5, 0.8)	4, 7, 9
6	138.1, CH	7.57 dd (8.5, 7.5)	8, 10
7	123.4, CH	7.14 dd (8.5, 0.8)	5, 8, 9
8	164.4, C		
9	112.9, C		
10	126.9, C		
11	44.2, C		
12	170.7, C		
13	87.8, C	4.50 d (3.5)	11, 12
		4.91 d (3.5)	14, 15
14	28.2, CH ₃	1.56 s	3, 11, 12, 15
15	28.1, CH ₃	1.56 s	3, 11, 12, 14
OH		11.98 s	7, 8, 9

kromatografi kolom (3,0x50 cm) dengan fase diam menggunakan silika gel.

Pemisahan menggunakan fase gerak n-butanol:etil asetat dengan konsep gradien dari perbandingan 100:0 hingga 0:100 dan setiap fraksi ditampung menggunakan vial. Dari jumlah 10 fraksi, fraksi 6 yang diperoleh dari perbandingan fase gerak 50% etil asetat:n-butanol, difraksinasi menggunakan dengan metode kromatografi kolom menggunakan sistem solven yang sama. Hasil pemisahan akhir, diperoleh isolat 1 (28 mg) dari penggunaan solven 30% etil asetat:n-butanol. Elusidasi struktur menggunakan metode infra merah, 1D-NMR, 2D-NMR, dan MS.

Uji Sitotoksisitas

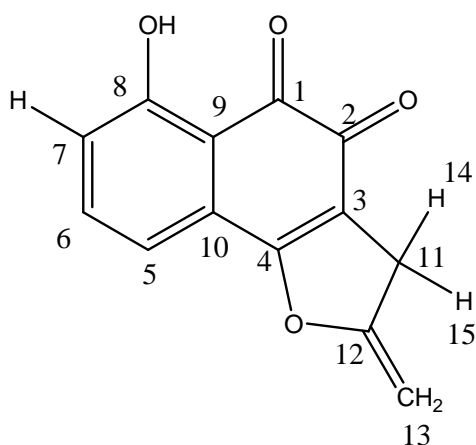
Uji sitotoksisitas menggunakan metode MTT. Sel kanker payudara T47D ditumbuhkan dengan media kultur RPMI, sel normal Vero dalam media kultur M199, masing-masing berisi FBS 10%, penisilin-streptomisin 1%, dan fungizon 0,5%. Konsentrasi larutan uji yang digunakan

adalah 7,81 ; 15,62 ; 31,25 ; 62,5 ; 125 ; 250 ; 500 µg/ml. Viabilitas sel ditentukan dengan absorbansi pada 595 nm menggunakan *plate reader*. Data absorbansi perlakuan dikonversi ke dalam persen viabilitas dan digunakan untuk menghitung IC₅₀. *Selectivity Index* (SI) merupakan hasil bagi antara IC₅₀ sel Vero dan IC₅₀ sel T47D.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Senyawa 1 mempunyai bentuk kristal berwarna kuning; UV-Vis (MeOH) maksimum (log) 213 (4.51); 257 (4.19); 416 (3.64) nm; IR (KBr) -maksimum 3426, 3074, 2925, 1734, 1617, 1122, 891 cm⁻¹; HRESIMS m/z 257.08077 [M + H]⁺ (C₁₅H₁₂O₄ 257.08139). Data ¹H dan ¹³C NMR disajikan pada Tabel 1. Data H-NMR menunjukkan signal dari tiga proton dari gugus benzena trisubstitusi (¹H 7.14 - 7.50). Dua pasang proton metilen olefinik (¹H 4.50 - 4.91), dua gugus metil yang ekuivalen (¹H 1.56), dan satu gugus hidroksi dengan ikatan proton

intramolekular (δ_{H} 11.98). Data C-NMR menunjukkan bahwa senyawa 1 mempunyai 15 atom karbon, termasuk dua gugus karbonil (δ_{C} 174.1 dan δ_{C} 184.1) yang mengindikasikan struktur 1,2 naptokuinon (5). Struktur senyawa 1 juga di dukung dengan data dari HMBC : H-5 (δ_{H} 7.32) dengan C-9 (δ_{C} 112.9), C-7 (δ_{C} 123.4), dan C-4 (δ_{C} 165.1); H-14 (δ_{H} 1.56) dengan C-9 (δ_{C} 112.9), C-12 (δ_{C} 170.7), C-11 (δ_{C} 44.2), dan C-3 (δ_{C} 122.7); dan gugus OH (δ_{H} 11.98) dengan C-9 (δ_{C} 112.9), C-8 (δ_{C} 164.4), dan C-7 (δ_{C} 123.4). Dari data-data tersebut disimpulkan bahwa senyawa 1 adalah turunan dehidrodunion, yaitu 2,3-dihydro-6-hydroxy-2-methylenaphtha-[1,2-b]furan-4,5-dione.



Gambar 1. Struktur senyawa 2,3-dihydro-6-hydroxy-2-methylenaphtha-[1,2b]furan-4,5-dione.

Data pada Tabel 2 menunjukkan parameter nilai IC_{50} , diperoleh dari hasil pengujian bahwa isolat 1 mempunyai nilai IC_{50} pada sel kanker T47D sebesar 9,88 $\mu\text{g/ml}$ dengan kategori aktif. Semakin kecil nilai IC_{50} suatu senyawa maka semakin besar efek sitotoksiknya. Nilai IC_{50} yang didapatkan pada perlakuan isolat 1 menunjukkan bahwa dapat dikembangkan sebagai sebagai agen kemopreventif karena didapatkan nilai IC_{50} yang lebih kecil dari

100 $\mu\text{g/mL}$ [6]. Kriteria dalam memilih senyawa antikanker terhadap sel kanker payudara didasarkan pada potensi, selektivitas, kemudahan dalam isolasi serta ketercukupan senyawa untuk diuji dan dikembangkan lebih lanjut.

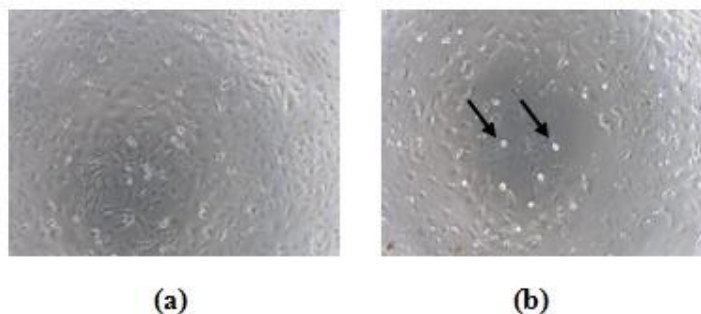
Nilai selektivitas suatu senyawa bertujuan untuk mengetahui tingkat keamanan suatu senyawa antikanker terhadap sel normal. Nilai *selectivity index* yang disyaratkan adalah > 3 , yang menandakan bahwa ekstrak, fraksi, atau isolat mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker tapi dengan pengaruh minimal pada sel normal, dan dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai agen kemopreventif [7]. Isolat 1 selektif membunuh sel kanker payudara T47D. Hal tersebut terlihat dari nilai *Selectivity index* isolat 1 dengan nilai >3 . Kuatnya aktivitas antikanker dikategorikan sebagai berikut: $IC_{50} = 5 \mu\text{g/mL}$ (sangat aktif); $IC_{50} = 5-10 \mu\text{g/mL}$ (aktif); $IC_{50} = 11-30$ (sedang); $IC_{50} = 30 \mu\text{g/mL}$ (tidak aktif) [8].

Selain dari hasil MTT assay, sitotoksitas yang disebabkan oleh perlakuan isolat 1 dapat diamati melalui perubahan morfologi sel. Perlakuan isolat 1 menyebabkan sel T47D mengalami perubahan morfologi yaitu inti sel tampak mengerut, terlihat sel yang mengalami kematian, dan jumlah sel berkurang, sedangkan sel tanpa perlakuan menunjukkan morfologi yang normal (Gambar 2b).

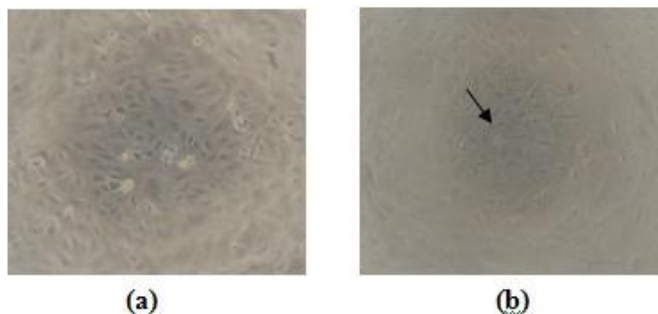
Efek sitotoksis isolat 1 terhadap sel Vero berdasarkan nilai IC_{50} dan profil morfologi sel menunjukkan efek yang lebih rendah jika dibandingkan dengan efeknya terhadap sel T47D. Perlakuan isolat 1 juga menyebabkan sel Vero mengalami perubahan morfologi, yaitu sel mengecil dan membulat namun diperlukan konsentrasi yang lebih tinggi untuk menghasilkan efek yang sama terhadap sel T47D, sedangkan sel tanpa perlakuan menunjukkan morfologi yang normal (Gambar 3b).

Tabel 2. Hasil Uji Sitotoksitas Isolat

Isolat	IC ₅₀ terhadap sel T47D ($\mu\text{g/mL}$)	IC ₅₀ terhadap sel Vero ($\mu\text{g/mL}$)	Selectivity index (SI)
1	9,88	298,65	30,23



Gambar 2. Efek perlakuan isolat 1 terhadap sel Vero. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop *inverted* dengan pembesaran 100x. (a) sel tanpa perlakuan; (b) Isolat 1 dengan konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$. Perubahan morfologi sel Vero ditunjukkan dengan gambar panah (\rightarrow).



Gambar 3. Efek perlakuan isolat 1 terhadap sel Vero. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop *inverted* dengan pembesaran 100x. (a) sel tanpa perlakuan; (b) Fraksi 4 dengan konsentrasi 300 $\mu\text{g/mL}$. Perubahan morfologi sel Vero ditunjukkan dengan gambar panah (\rightarrow).

4. KESIMPULAN

Isolasi senyawa aktif dari ekstrak etanol kulit batang faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) telah berhasil dilakukan. Senyawa aktif tersebut berupa senyawa turunan naftokuinon yaitu *2,3-dihydro-6-hydroxy-2-methylenaphtha-[1,2b]furan -4,5-dione*. Senyawa tersebut aktif sebagai antikanker terhadap sel kanker payudara T47D dengan

kategori aktif dengan IC₅₀ sebesar 9,88 $\mu\text{g/mL}$ and indek selektifitas sebesar 30,23.

5. PUSTAKA

- [1] Rollando R, Siswadi S. 2016. Penelusuran Potensi Aktivitas Sitotoksik Fraksi Kulit Batang Tumbuhan Faloak (*Sterculia quadrifida* R. Br). *E-Publikasi Ilmiah Fakultas Farmasi Unwahas Semarang*, 13(1):27–32.

- [2] Rollando R, Prilianti KR. 2017. Fraksi Etil Asetat Kulit Batang Faloak (*Sterculia quadrifida* R. Br) Menginduksi Apoptosis dan Siklus Sel Pada Sel Kanker Payudara T47D. *J Pharm. Sci. Community*, 14(1):1–14.
- [3] WHO | Cancer [Internet]. WHO. [cited 2016 Aug 30]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
- [4] Globocan 2012 - Home [Internet]. [cited 2017 Jun 22]. Available from: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
- [5] Arnason J.T., Mata R, Romeo J.T. 2013. *Phytochemistry of Medicinal Plants*. Springer Science & Business Media;. 369 p.
- [6] Dey P.M. 2012. *Methods in Plant Biochemistry*. Academic Press;. 565 p.
- [7] Prayong P, Barusrux S, Weerapreeyakul N. 2008. Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. *Fitoterapia*, 79(7):598–601.
- [8] Choi E.J., Kim T., Lee M.S. 2007. Pro-apoptotic effect and cytotoxicity of genistein and genistin in human ovarian cancer SK-OV-3 cells. *Life Science*, 80(15):1403–8.