

Turunan Senyawa Naptokuinon Dari Kulit Batang Faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) Dan Efek Sitotoksik Pada Sel Kanker Payudara Jenis T47D

Rollando Rollando¹, 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

Submitted :.....

Reviewed :.....

Accepted:.....

ABSTRAK

Faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) digunakan secara empiris oleh penduduk Nusa Tenggara Timur sebagai tanaman obat. Informasi senyawa aktif yang terkandung didalam kulit faloak secara spesifik belum dipublikasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui senyawa aktif yang terdapat didalam kulit faloak yang mempunyai efek sitotoksik pada sel kanker payudara jenis T47D. 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 sitotoksik pada sel kanker payudara T47D menggunakan metode MTT. Hasil isolasi diperoleh isolat turunan senyawa naptokuinon yaitu 2,3-dihydro-6-hydroxy-2-methylenenaphtho[1,2-b]furan-4,5-dione dengan nilai IC₅₀ pada sel kanker payudara T47D sebesar 9,88 µg/mL dan dengan nilai selektivitas indeks sebesar 30,23.

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

ABSTRACT

Faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) is used empirically by residents of East Nusa Tenggara for drug plant. The information of the active compound contained in the faloak bark yet specifically published. This study aims to determine the active compound contained in the faloak bark that have cytotoxic activity to T47D breast cancer cells. Extraction process using maceration method, isolation process using gradien isolation method, elusidation using combination of information of IR spectra, 1D-NMR, 2D-NMR and LC-MS, and cytotoxic activity test on T47D breast cancer cells using MTT method. The isolation result obtained that isolate of naphthoquinone derivative compound is 2,3-dihydro-6-hydroxy-2-methylenenaphtho [1,2-b] furan-4,5-dione with IC₅₀ value on T47D breast cancer cell was 9,88 µg/mL and with an index selectivity value was 30,23.

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

Penulis Korespondensi:

Rollando

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

Email: ro.llando@machung.ac.id

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 (Rollando dan Prilianti, 2017). 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 (Rollando dan Siswadi, 2016). Rollando dan Prilianti melaporkan bahwa fraksi etil asetat dari kulit batang faloak mampu menginduksi apoptosis dan siklus sel pada sel kanker payudara jenis T47D (Rollando dan Prilianti, 2017).

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 (Bray *et al.*, 2012). 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. Salah satu permasalahan yang sering timbul dalam pengobatan kanker adalah resistensi obat kemoterapi (*drug resistance*) (Ferlay *et al.*, 2012). Oleh sebab itu diperlukan jalan keluar untuk mengatasi resistensi, diantaranya eksplorasi senyawa kimia dari bahan alam sebagai antikanker. 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.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Kolom kromatografi, chamber (sigma), *vacuum rotary evaporator* (Junke & Kunkel), *inverted microscope*, *elisa reader*, *vortex* (junke & kunkel), *waterbath* (labo-tech, 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), FTIR (FTIR-100 Perkin Elmer)MS (Mariner Biospectrometry Sistem HRESIMS) dan spektrometer NMR (Delta 2 400 MHz untuk $^1\text{H-NMR}$ dan 100 MHz untuk $^{13}\text{C-NMR}$).

Kulit batang faloak, aquadest, etanol (teknis), metanol (Merck), n-heksana (Merck), n-butanol (Merck), etil asetat (Merck), buffer fosfat (Merck), potasium ferrisianida (Merck), FeCl_3 (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),

trypsin-EDTA 0,25% (Gibco), media M119, reagen MTT [3-(4,5-dimetil thiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium 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.

Jalannya Penelitian

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 kromatografi kolom (3,0x50 cm) dengan fase diam 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 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 Sitotoksik

Uji sitotoksitas 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.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil ekstraksi terhadap 1,5 kg serbuk kering kulit batang falok diperoleh 60,76 g ekstrak etanol dan hasil pemisahan dengan kromatografi kolom gravitasi diperoleh fraksi 1-10 dengan eluen campuran n-butanol dan etil asetat yang berubah secara gradien. Hasil KK gravitasi ditampung dalam botol 20 mL dan dilakukan pemisahan sistem KK yang sama. Masing-masing fraksi diuapkan, kemudian dilakukan uji noda dengan KLT agar diketahui fraksi yang mempunyai R_f yang sama untuk kemudian digabungkan. Dari proses ini diperoleh 4 fraksi, fraksi berbentuk kristal warna kuning. Setelah di rekristalisasi dan dianalisis sifat fisika dan spektroskopinya, diperoleh informasinya bahwa senyawa tersebut (kemudian disebut senyawa 1) mempunyai bentuk kristal berwarna kuning; titik leleh 423-425 °C. Rotasi spesifik [α]_D²⁵ = -287 (kloroform), larut dalam aseton, diklorometana, dan n-butanol.

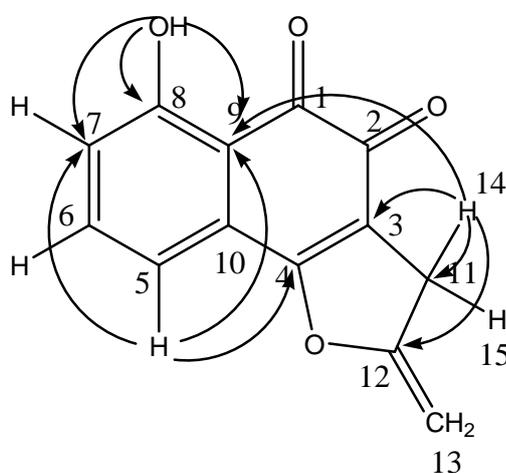
Hasil pengukuran senyawa 1 menggunakan spektroskopi UV pada panjang gelombang antara 200-500 nm, menunjukkan bahwa senyawa tersebut memberikan serapan maksimum dalam diklorometana pada panjang gelombang (λ) (log ε) 213 (4.51); 257 (4.19); 416 (3.64) nm. Berdasarkan literatur, senyawa naptokuinon memiliki karakteristik berupa serapan maksimum pada 213 & 257 nm (Inue *et al.*, 1983). Hasil pengukuran menggunakan IR (KBr) diperoleh - maksimum 3426 (gugus -OH), 3074 (senyawa aromatik), 2925 (gugus -C-H), 1734 (gugus -C=O), 1617 (gugus -C=C-), 1122 (gugus -C-O-C-) cm⁻¹ (Pavia *et al.*, 2014). Hasil pengukuran spektokopi massa menunjukkan data HRESIMS mempunyai m/z 257.08077 [M + H]⁺ (terkalkulasi C₁₅H₁₂O₄ 257.08139).

Tabel I. Data NMR (400 MHz, CDCl₃) senyawa 1

Posisi	δ, tipe	J _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) 4.91 d (3.5)	11, 12 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

Data ¹H dan ¹³C NMR disajikan pada tabel 1. Data H-NMR pada tabel 1 menunjukkan signal dari tiga proton dari gugus benzena trisubstitusi (δ_H 7.14 - 7.50). Dua pasang proton metilen olefinik (δ_H

4.50 – 4.91), dua gugus metil yang ekuivalen (δ_{H} 1.56), dan satu gugus hidroksi dengan ikatan proton intramolekular (δ_{H} 11.98). Data C-NMR pada tabel 1 menunjukkan 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 (Arnason *et al.*, 2013). Struktur senyawa 1 juga di dukung dengan data dari HMBC, pada spektrum HMBC adanya korelasi antara proton dengan C yang berdekatan yang berjarak maksimal 3 ikatan dimana data korelasi dapat dilihat pada 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-methylenenaphtho[1,2-b]furan-4,5-dione*.



Gambar 1. Struktur senyawa 1, (HMBC = \curvearrowright)

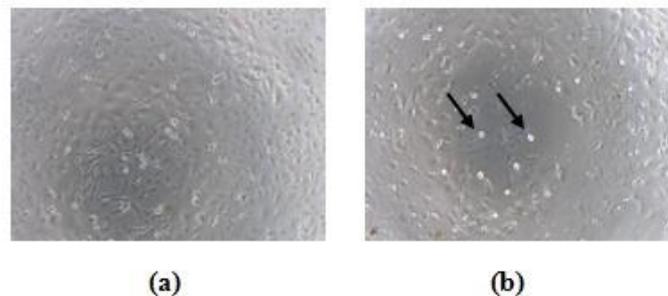
Data pada tabel II menunjukkan parameter nilai IC_{50} , diperoleh dari hasil pengujian bahwa isolat 1 mempunyai nilai IC_{50} pada sel kanker T47D sebesar 9,88 $\mu\text{g/ml}$ dengan kategori aktif. Semakin kecil nilai IC_{50} suatu senyawa maka semakin besar efek sitotoksiknya. Nilai IC_{50} yang didapatkan pada perlakuan isolat 1 menunjukkan bahwa dapat dikembangkan sebagai sebagai agen kemopreventif karena didapatkan nilai IC_{50} yang lebih kecil dari 100 $\mu\text{g/mL}$ (Dey, 2012). 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.

Tabel 2. Hasil uji sitotoksik isolat

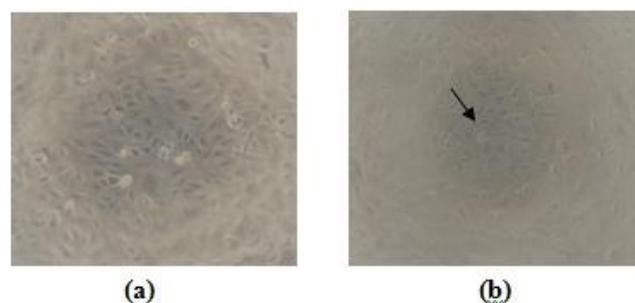
Isolat	IC_{50} T47D ($\mu\text{g/ml}$)	IC_{50} Vero ($\mu\text{g/ml}$)	Selectivity index (SI)
1	9,88	298,65	30,23

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 (Prayong *et al.*, 2008). 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); $IC_{50} = 5\text{-}10 \mu\text{g/mL}$ (aktif); $IC_{50} = 11\text{-}30$ (sedang); $IC_{50} = 30 \mu\text{g/mL}$ (tidak aktif) (Choi *et al.*, 2007).

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).



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)

Efek sitotoksik 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). Sel menunjukkan adanya perubahan morfologi yang dimungkinkan karena sitoskeleton terpotong dan protein yang berperan dalam perlekatan sel tidak mengalami polimerisasi sehingga ikatan sel terlepas dan membran lipid akan membulat (Gambar 2 dan Gambar 3). Penurunan viabilitas sel dan kepadatan sel terlihat pada semakin tinggi dosis yang digunakan, serta dengan perubahan morfologi yang mengalami pengerutan merupakan penanda sel yang menuju kematian.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat 1 adalah turunan senyawa naptokuinon dengan nama kimia *2,3-dihydro-6-hydroxy-2-methylenenaphtho[1,2-b]furan-4,5-dione* yang mempunyai aktivitas sitotoksik pada sel kanker payudara jenis T47D dengan kategori aktif dengan IC₅₀ 9,88 µg/ml.

DAFTAR PUSTAKA

- Arnason, J.T., Mata, R., Romeo, J.T., 2013. *Phytochemistry of Medicinal Plants*. Springer Science & Business Media.
- Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. 2012. Global Cancer Transitions According to the Human Development Index (2008–2030): A Population-Based Study. doi:10.1016/S1470-2045(12)70211-5.
- 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 Sci.* 80, 1403–1408. doi:10.1016/j.lfs.2006.12.031
- Dey P.M. 2012. *Methods in Plant Biochemistry*. Academic Press;. 565.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M. 2012. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: Sources, Methods and Major Patterns in GLOBOCAN. *Int J Cancer* 2015;136:E359–86. doi:10.1002/ijc.29210.
- Pavia, D., Lampman, G., Kriz, G., dan Vyvyan, J., 2014. *Introduction to Spectroscopy*. Cengage Learning.
- Prayong, P., Barusrux, S., Weerapreeyakul, N., 2008. Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. *Fitoterapia* 79, 598–601. doi:10.1016/j.fitote.2008.06.007
- Rollando, R., Prilianti, K.R., 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, 1–14.
- Rollando, R., Siswadi, S., 2016. Penelusuran potensi aktivitas sitotoksik fraksi kulit batang tumbuhan faloak (*Sterculia quadrifida* R. Br). *E-Publ. Ilm. Fak. Farm. Unwahas Semarang* 13, 27–32.