

SENYAWA DAMARA-20,24-DIEN-3-ON YANG BERAKTIVITAS SITOTOKSIK TERHADAP SEL MCF-7 DARI KULIT BATANG CHISOCHETON MACROPHYLLUS (MELIACEAE)

Nurlelasari, Nurabi Ferdiana, Subekti Mauluddian, Desi Harneti

Moelyono Moekti, Wardoyo, Rizki Abdullah, Unang Supratman, dan Khalijah Awang

Institut Teknologi Bandung

email korespondensi: u_supratman@unpad.ac.id

Abstrak

Senyawa triterpenoid damaran, damara-20,24-dien-3-on (1) telah diisolasi dari kulit batang Chisocheton macrophyllus (Meliaceae). Struktur kimia kedua senyawa tersebut telah ditetapkan berdasarkan data spektroskopi dan perbandingan data spektra yang diperoleh dari literatur. Senyawa damara-20,24-dien-3-on menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara manusia MCF-7 dengan nilai IC₅₀ 28 mM.

Kata kunci: Aktivitas sitotoksik, sel MCF-7, triterpenoid damaran, Chisocheton macrophyllus, Meliaceae.

Abstract

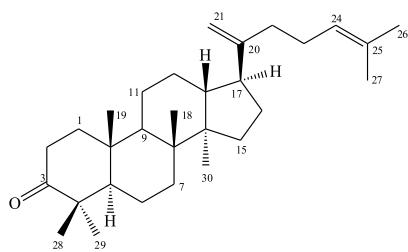
Dammarane triterpenoid, dammara-20,24-dien-3-one (1) has been isolated from the bark of Chisocheton macrophyllus (Meliaceae). Chemical structure of compound was determined on the basis of spectroscopic data and comparison with those spectra data previously reported. Compound dammara-20,24-dien-3-one exhibited cytotoxic activity against MCF-7 human breast cancer cell lines with IC₅₀ values of 28 mM, respectively.

Key words: Cytotoxic activity, MCF-7 cell, dammarane triterpenoid, Chisocheton macrophyllus, Meliaceae.

PENDAHULUAN

Genus Chisocheton, salah satu anggota famili Meliaceae terdiri dari 50 spesies yang terdistribusi merata di India, Thailand, Malaysia dan Indonesia. Genus Chisocheton adalah tumbuhan subtropis dan tropis yang telah dikenal mengandung senyawa limonoid yang beraktivitas insektisidal. Studi fitokimia sebelumnya pada spesies Chisocheton telah dilaporkan adanya beberapa senyawa yang menarik meliputi limonoid, senyawa tipe-meliasin yang beraktivitas antijamur, triterpenoid damaran, dan alkaloid spermidin. Dalam penelitian berkelanjutan kami dalam pencarian senyawa antikanker dari tumbuhan Meliaceae Indonesia, ekstrak metanol Chisocheton macrophyllus menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara manusia MCF-7 dengan nilai IC₅₀ 40,5 mM.

C. macrophyllus, adalah tumbuhan tinggi dan ditemukan tumbuh di hutan hujan tropis di bagian utara pulau Sulawesi, Indonesia. Tanaman ini dikenal dengan nama ma-aa di Sulawesi dan minyak dari bijinya digunakan untuk penerangan. Penelitian sebelumnya, telah melaporkan bahwa daun C. macrophyllus mengandung triterpenoid damaran yang beraktivitas antitumor, tetapi kulit batang dari tanaman ini belum dilaporkan kandungan kimianya. Pada paper ini, kami akan menjelaskan isolasi, identifikasi struktur dan aktivitas sitotoksik triterpenoid damaran dari kulit batang C. macrophyllus.



PERCOBAAN

Umum. Titik leleh diukur dengan peralatan titik leleh Fisher-John (tidak terkoreksi). Spektra IR diperoleh dari spektrofotometer FTIR spectrum One Perkin Elmer pada KBr. Spektra 1H- dan 13C-NMR diperoleh dengan spektrometer JEOL JNM ECA-500. Spektra MS diperoleh dengan Mariner Biospectrometry-Finnigan instrument. Pemisahan kromatografi dilakukan pada silika gel G60, silika gel (70-230 dan 200-400 mesh, Merck). KLT plat diisi dengan silika gel GF₂₅₄ (Merck, 0,25 mm) dan deteksi di lakukan dengan penampak noda 10% H₂SO₄ dalam etanol diikuti dengan pemanasan.

Bahan tanaman. Kulit batang C. macrophyllus diperoleh dari Kebun Raya Bogor, Jawa Barat pada bulan September 2011. Tumbuhan ini dideterminasi di Herbarium Bogoriense, Pusat penelitian Biologi, LIPI, Bogor dan contoh specimen (No. Bo-1295450) tersimpan di Herbarium tersebut.

Ekstraksi dan Isolasi. Serbuk kering kulit batang C. macrophyllus (3,1 Kg) diekstraksi berturut-turut dengan n-heksan, etil asetat dan metanol pada temperatur kamar. Setelah penguapan pelarut pada tekanan rendah dihasilkan berturut-turut ekstrak n-heksan (38,8 g), etil asetat (53,5 g) dan metanol (137,2 g). Ekstrak n-heksan (38,8 g) dipisahkan dengan kromatografi cair vakum (KCV) dengan eluen n-heksan-ethyl asetat-metanol, yang meningkat kepolarannya sehingga dihasilkan 5 fraksi utama (A-E), digabungkan berdasarkan analisis KLT. Fraksi C (17,7 g) dipisahkan lebih lanjut dengan kromatografi kolom pada silika gel (230-400 mesh) dengan eluen n-heksan:kloroform (1:1) sehingga dihasilkan 5 fraksi utama (C1-C5), digabungkan berdasarkan analisis KLT. Fraksi C3 (6,1g) dipisahkan lebih lanjut dengan kromatografi kilat pada silika gel (200-400 mesh) dengan campuran eluen n-heksan:kloroform (4:1) diperoleh 5 fraksi utama (C3.1-C3.5). Pada fraksi C3.2 dihasilkan endapan dan dimurnikan lebih lanjut dengan kristalisasi dalam metanol dihasilkan senyawa damara-20,24-dien-3-on (18 mg).

Damara-20,24-dien-3-on (1), diperoleh berupa kristal jarum tak berwarna; titik leleh, 141–143 °C; IR (KBr) ν_{max} 1709, 1611, 1015 cm⁻¹. ¹H- dan ¹³C-NMR (CDCl_3 , 500 MHz untuk ¹H- dan 125 MHz untuk ¹³C-NMR); lihat Tabel 1. HR-ESI-TOFMS (*m/z* 957,12 [2M+Ag]⁺.

Uji Sitotoksik.¹⁷ Sel kanker payudara manusia MCF-7 (ATCC, Manassas, VA, USA) dikultur pada medium RPMI-1640 (Sigma, MO, USA), ditambah 10% serum fetal bovin dan antibiotik (100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin). Untuk perlakuan sel, beberapa konsentrasi dari senyawa uji ditambahkan pada medium kultur sel selama 24 jam. Analisis proliferasi sel dilakukan terhadap beberapa konsentrasi senyawa uji melalui uji MTT kalorimetri. Sel (2×10^4 in 50 µL/lubang) ditempatkan pada plat 96 lubang. Setelah penambahan sel awal, beberapa konsentrasi dari senyawa uji ditambahkan dan diinkubasi selama 24 jam. 10 mL dari tetrazolium yang larut dalam air (WST)-uji kit ploriferasi cepat (Biovision, CA, USA) ditambahkan pada masing-masing lubang dan diinkubasi selama 37°C selama 3 hari. Setelah penambahan 100 µL/lubang dari 1 N HCl, laju proliferasi sel ditentukan dengan pengukuran serapan pada panjang gelombang 450 nm, dengan panjang gelombang referensi 650 nm. Serapan dibaca dengan pembaca plat mikrotiter (Thermo Scientific, MA, USA).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Senyawa 1 diperoleh berupa kristal jarum tak berwarna. Rumus molekul senyawa 1 ditetapkan sebagai $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}$ berdasarkan spektrum massa (*m/z* 957,12 [2M+Ag]⁺, bersama dengan data NMR (Tabel 1), dengan demikian senyawa 1 memiliki 7 derajat ketidakjenuhan. Senyawa 1 transparan di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 dan 367 nm, menunjukkan tidak adanya ikatan rangkap terkonyugasi. Spektrum IR menunjukkan adanya serapan yang berasal dari gugus karbonil (ν_{max} 1709 cm⁻¹), ikatan rangkap dua terisolasi (ν_{max} 1611 cm⁻¹) dan eter (ν_{max} 1015 cm⁻¹). Spektrum ¹H NMR menunjukkan adanya sinyal proton dari tujuh metil tersier pada δH 0,88; 0,95; 1,02; 1,05; 1,09; 1,62; dan 1,70 (masing-masing 3H, singlet), satu proton metin sp₂ pada δH 5,13 (1H, m) dan dua proton sp₂ terminal pada δH [4,72 (1H, d, $J=8,2$ Hz) dan 4,75 (1H, d, $J=8,2$ Hz)]. Spektrum ¹³C NMR menunjukkan adanya 30 sinyal karbon yang diperinci dengan percobaan DEPT dan HMQC sebagai satu karbonil pada δC 218,1; satu sinyal sp₂ metin pada δC 124,4; satu sinyal sp₂ metilen pada δC 107,6; dua sinyal sp₂ kuarternier pada δC 152,5 dan 131,4; sepuluh karbon metilen sp₃, empat karbon metin sp₃, empat karbon sp₃ kuarternier, dan tujuh karbon metil tersier. Fungsionalitas ini dihitung sebagai tiga dari tujuh total derajat ketidakjenuhan, empat derajat ketidakjenuhan tersisa sesuai dengan kerangka triterpenoid damaran tetrasiklik.

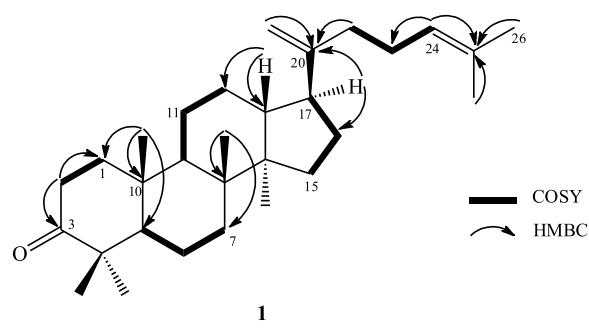
Untuk menentukan posisi gugus karbonil dan olefinik pada senyawa 1, percobaan COSY dan HMBC dilakukan dan hasilnya dapat dilihat pada Gambar 1. Pada spektrum HMBC, korelasi yang tampak dari proton metil tersier terhadap karbon tetangganya dapat menjelaskan keberadaan tujuh metil tersier pada

Tabel 1. Data NMR untuk senyawa 1 dalam CDCl_3

Posisi C	δC ppm (Mult.)	1	
		δH ppm (Int.; Mult., $J=\text{Hz}$)	
1	39,9 (d)	1,47 (1H, m); 1,96 (1H, m)	
2	34,1 (d)	1,98 (1H, m); 2,47 (1H, m)	
3	218,1 (s)		-
4	47,4 (s)		-
5	53,4 (d)	1,38 (1H, m)	
6	19,7 (t)	1,49 (1H, m); 1,58 (1H, m)	
7	34,7 (t)	1,32 (1H, m); 1,66 (1H, m)	
8	40,3 (s)		-
9	50,3 (d)	1,40 (1H, m)	
10	36,9 (s)		-
11	21,9 (t)	1,26 (1H, m); 1,55 (1H, m)	
12	28,9 (t)	1,43 (1H, m); 1,94 (1H, m)	
13	45,4 (d)	1,67 (1H, m)	
14	49,4 (s)		-
15	31,3 (t)	1,13 (1H, m); 1,58 (1H, m)	
16	24,9 (t)	1,20 (1H, m); 1,60 (1H, m)	
17	47,7 (d)	2,18 (1H, m)	
18	15,8 (q)	0,88 (3H, q)	
19	16,1 (q)	0,95 (3H, q)	
20	152,5 (s)		-
21	107,6 (t)	4,72 (1H, d, $J=8,2$); 4,75 (1H, d, $J=8,2$)	
22	34,1 (t)	1,97 (1H, m); 2,02 (1H, m)	
23	27,1 (t)	2,13 (1H, m); 2,40 (1H, m)	
24	124,4 (d)	5,13 (1H, m)	
25	131,4 (s)		-
26	25,7 (q)	1,70 (3H, q)	
27	17,7 (q)	1,62 (3H, q)	
28	21,1 (q)	1,05 (3H, q)	
29	16,7 (q)	1,09 (3H, q)	
30	15,3 (q)	1,02 (3H, q)	

senyawa 1. Dua proton metilen pada δH 1,47 dan 1,98 saling terjodoh satu sama lain dan berkorelasi dengan C-3 (δC 218,1) dan C-4 (δC 47,4), sedangkan proton metil pada δH 1,05 berkorelasi dengan C-3 (δC 218,1) dan C-5 (δC 53,4), menyarankan bahwa gugus karbonil terletak pada C-3. Dua proton olefinik pada δH 4,72 dan 4,75 saling terjodoh dua ikatan (²*J*) dan berkorelasi dengan C-20 (δC 152,5), C-17 (δC 47,7) dan C-22 (δC 34,1), sedangkan proton metin pada δH 2,18 berkorelasi dengan C-20 (δC 152,5), C-16 (δC 24,9) dan C-22 (δC 34,1), menyarankan posisi gugus olefinik terminal terletak pada C-20 dan C-21 (Δ 20,21). Proton olefinik pada δH 5,13 berkorelasi dengan C-25 (δC 131,4) dan C-23 (δC 27,1), sedangkan proton metil pada δH 1,70 berkorelasi dengan C-25 (δC 131,4) dan C-24 (δC 124,4), menyarankan posisi ikatan rangkap dua yang lain terletak pada C-24 dan C-25. Perbandingan data NMR senyawa 1 dengan damara-20,24-dien-3-on, menunjukkan kesesuaian yang tinggi, dengan demikian senyawa 1 diidentifikasi sebagai damara-20,24-dien-3-on.

Senyawa damara-20,24-dien-3-on menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara manusia MCF-7 dengan nilai IC₅₀ 28 µM.



DAFTAR PUSTAKA

- Yang, M. H., Wang, J. S., Luo, J. G., Wang, X. B., Kong, L. Y., "Tetranortriterpenoids from *Chisocheton paniculatus*" *J. Nat. Prod.* 2009, 72, 2014-2018.
- Hidayat, S.S., Hutapea, J.R., "Indonesian Medicinal Plants", Research and Development Agency, Ministry of Health, Jakarta, Indonesia, 1991.
- Heyne, K., "The Useful Indonesian Plants", Research and Development Agency, Ministry of Forestry, Jakarta, Indonesia, 1982.
- Jain, D. C., and Tripathi, A.K., "Potential of natural products as insect antifeedant". *Phytother. Res.*, 1993, 7, 327-334.
- Roy, A., and Sarat, S., "Limonoids: Overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom". *Biol. Pharm. Bull.*, 2006, 29, 191-201.
- Siddiqui, B. S., Afshan, F., Ghiasuddin, F.S., Naqvi, S. N. H., Tariq, R. M., "Two insecticidal tetranortriterpenoids from *Azadirachta indica*". *Phytochemistry*, 2000, 53, 371-376.
- Najmuldeen, I. A., Hadi, A. H. A., Awang, K., Mohamad, K., Ketuly, K. A., Mukhtar, M. R., Chong, S. L., Chan, G., Nafiah, M. A., Weng, N. S., Shirota, O., Hosoya, T., Nugroho, A., Morita, H., "Chisomicines A-C, Limonoids from *Chisocheton ceramicus*". *J. Nat. Prod.*, 2011, 74, 1313-1317.
- Wong, C. P., Shimada, M., Nagakura, Y., Nugroho, A. E., Hirasawa, Y., Kaneda, T., Awang, K., Hadi, A. H. A., Mohamad, K., Shiro, M., Morita, H., "Ceramicines E-I, New limonoids from *Chisocheton ceramicus*". *Chem. Pharm. Bull.*, 2011, 59(1), 407-411.
- Laphookhieo, S., Maneerat, W., Koysomboon, S., Kiattansuki, R., Chantrapromma, K., Syera, J. K., "A novel limonoid from the seeds of *Chisocheton siamensis*". *Can. J. Chem.*, 2008, 86, 205-208.
- Connolly, J. D., Labbe, C., Rycroft, D. S., Taylor, D. A. H., "Tetranortriterpenoids and related compounds. Part 22. New apotirucallol derivatives and tetranortriterpenoids from the wood and seeds of *Chisocheton paniculatus* (Meliaceae)". *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1979, 12, 2959-2964.
- Gunning, P. J., Jeffts, L. B., Isman, M. B., Towers, G. H. N., "Two limonoids from *Chisocheton microcarpus*". *Phytochemistry*, 1994, 36, 1245-1248.
- Bordoloi, M., Saikia, B., Mathur, R. K., Goswami, B. N., "A meliacin from *Chisocheton panniculatus*". *Phytochemistry*, 1993, 34, 583-584.
- Inada, A., Somekawa, M., Murata, H., Nakanishi, T., Tokuda, H., Nishino, H., Iwashima, A., Darnaedi, D., Murata, J., "Phytochemical studies on Meliaceous plants. VIII. Structures and inhibitory effects on epstein-barr virus activation of triterpenoids from leaves of *Chisocheton macrophyllus King*". *Chem. Pharm. Bull.*, 1993, 41(3), 617-619.
- Chan, K. Y., Mohamad, K., Ooi, A. J. A., Imiyabir, Z., Chung, L. Y., "Bioactivity-guided fractionation of the lipoxygenase and cyclooxygenase inhibiting constituents from *Chisocheton polyandrus Merr*". *Fitoterapia*, 2012, 83, 961-967.
- Stevens, P. F., "Review of *Chisocheton* (Meliaceae) in Papua". *Division of Botany, Department of Forest, Lae, Papua New Guinea*. Present: The Arnold Arboretum of Harvard University, Cambridge, Massachusetts, 1980, 02138, USA.
- Vossen, V. D., and Umali, B. E., "Plant Resources of South East Asia, No. 14, Vegetable oil and fats". Prosea Foundation, Bogor, Indonesia, 2002.
- Faried, A., Faried, L. S., Kimura, H., Sohda, M., Nakajima, M., Miyazaki, T., Kato, H., Kanuma, T., Kuwano, H., "Differential sensitivity of paclitaxel-induced apoptosis in human esophageal squamous cell carcinoma cell lines". *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2006, 57(3):301-308.
- Chan, K. Y., Mohamad, K., Ooi, A. J. A., Imiyabir, Z., Chung, L. Y., "Bioactivity-guided fractionation of the lipoxygenase and cyclooxygenase inhibiting constituents from *Chisocheton polyandrus Merr*". *Fitoterapia*, 2012, 83, 961-967.
- Phongmaykin, J., Kumamoto, T., Ishikawa, T., Suttisri, R., Saifah, E., "A new sesquiterpene and other constituents of *Chisocheton penduliflorus*". *Arch. Pharm. Res.*, 2008, 31, 21-27.
- Revesz, L., Hiestand, P., La Vecchia, L., Naef, R., Naegeli, H. U., Oberer, L., "Isolation and synthesis of a novel immuno-suppressive 17a-substituted damarane from the flour of the Palmyrah palm (*Borassus flabellifer*)". *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, 9, 1521-1526.