

AKTIVITAS ANTIKANKER SENYAWA TURUNAN KUMARIN DARI *Melicope latifolia*

Anticancer Activity of Coumarin Derivatives from Melicope latifolia

Indatul Fitriyah¹⁾, Tjitjik Srie Tjahjandarie¹⁾, Ratih Dewi Saputri¹⁾, Mulyadi Tanjung¹⁾

¹⁾ Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya

¹⁾e-mail: mulyadi-t@fst.unair.ac.id

DOI: 10.20527/jstk.v15i1.8617

Submitted: June 16, 2020; Revised version accepted for publication: December 13, 2020

Available online: January 21, 2021

ABSTRAK

Melicope latifolia (DC.) T.G. Hartley merupakan tumbuhan endemik Bali yang termasuk famili Rutaceae. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengeksplorasi aktivitas antikanker senyawa turunan kumarin dari buah *M. latifolia*. Ekstraksi senyawa turunan kumarin yang terdapat dalam buah *M. latifolia* menggunakan metanol. Dua senyawa turunan kumarin, alosantoksiletin (**1**) dan isopimpinellin (**2**) telah berhasil diisolasi dan struktur kimianya ditetapkan dengan spektroskopi MS resolusi tinggi, 1D NMR (¹H, ¹³C) dan 2D NMR (HMBC, HMQC). Uji aktivitas terhadap sel murine leukemia (P-388) menggunakan metode MTT menunjukkan nilai kemampuan daya hambat IC₅₀ = 3,41 ± 0,31 untuk alosantoksiletin dan 23,70 ± 1,37 µg/mL untuk isopimpinelin.

Kata Kunci: *Melicope latifolia*, kumarin, antikanker.

ABSTRACT

Melicope latifolia (DC.) T.G. Hartley is a Balinese endemic that belongs to the family Rutaceae. The purpose of this study was to explore the anticancer activity of coumarin derivatives from *M. latifolia* fruits. Extraction of coumarin derivatives found in *M. latifolia* was done using methanol. Two coumarin derivatives, alloxanthoxyletin (**1**) and isopimpinellin (**2**) were isolated and their chemical structures were determined by using high-resolution MS, 1D NMR (¹H, ¹³C) and 2D NMR (HMBC, HMQC) spectroscopy analysis. The activity on murine leukemia (P-388 cells) using the MTT method showed inhibitory ability the IC₅₀ = 3.41 ± 0.31 µg /mL for alloxanthoxyletin, and 23.70 ± 1.37 µg /mL for isopimpinelin.

Keywords: *Melicope latifolia*, anticancer.

PENDAHULUAN

Melicope termasuk dalam genus dari famili jeruk-jerukan (Rutaceae). *Melicope* menghasilkan senyawa golongan fenolik seperti benzopiran (Xu *et.al.*, 2016), flavonoid (Saputri *et.al.*, 2018) dan kumarin (Chou *et.al.*, 2005). Senyawa golongan fenolik *Melicope* memperlihatkan adanya rantai samping terpenil antara lain prenil, farnesil dan geranil. Senyawa kumarin termasuk salah satu senyawa golongan arilpropanoid. Biosintesis

senyawa kumarin *Melicope* berasal dari jalur sikhimat yang berasal dari tirosin. Pembentukan senyawa kumarin melalui reaksi isomerase asam sinamat dan diikuti dengan reaksi siklisasi. Biosintesis senyawa kumarin terisoprenilasi *Melicope* berasal dari reaksi substitusi elektrofilik yang diaktifkan oleh gugus hidroksi atau metoksi yang terikat pada inti aromatik kumarin. Gugus hidroksi atau metoksi merupakan pengarah *orto* atau para bereaksi dengan isopentenil pirofosfat

menghasilkan keragaman senyawa kumarin terisoprenilasi (Chou *et.al.*, 2005). Senyawa kumarin terisoprenilasi *Melicope* memperlihatkan berbagai aktivitas biologis seperti antioksidan (Kassim *et.al.*, 2013), insektisida (Putri *et.al.*, 2020) dan antikanker (Chou *et.al.*, 2005; Saputri *et.al.*, 2019). *M. latifolia* merupakan tumbuhan endemik yang ditemukan di seluruh Kepulauan Indonesia dan dimanfaatkan untuk pengobatan demam, dan tekanan darah tinggi (Hartley *et.al.*, 2001). Tujuan dari riset ini adalah untuk mengeksplorasi senyawa turunan kumarin yang terkandung dalam buah *M. latifolia*. Sitotoksik senyawa turunan kumarin kepada sel kanker murin leukemia P-388 akan diterangkan secara singkat. Sitotoksik turunan kumarin buah *M. latifolia* kepada sel P-388 belum pernah dilaporkan data publikasinya.

METODOLOGI PENELITIAN

Prosedur Umum

Fasa diam yang digunakan berupa silika gel selama dalam proses pemisahan, antara lain Si gel 60 GF₂₅₄ untuk KLT, Si gel 60 untuk KKG dan Si gel 60 PF₂₅₄ untuk planar kromatografi radial (PKR). Penentuan serapan maksimum senyawa turunan kumarin dalam MeOH menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis Tracer 1800 (Shimadzu). Penentuan gugus fungsi senyawa dalam pelet KBr menggunakan spektrofotometer IR Tracer 100 (Shimadzu). Massa molekul dan rumus kimia senyawa turunan kumarin menggunakan spektrometer MS resolusi tinggi Merck Waters. Fokus penentuan struktur menggunakan NMR JEOL

dengan kapasitas 400 MHz. Sitotoksik senyawa hasil isolasi menggunakan sel P-388 (murin leukemia) menggunakan metode MTT.

Bahan Tanaman

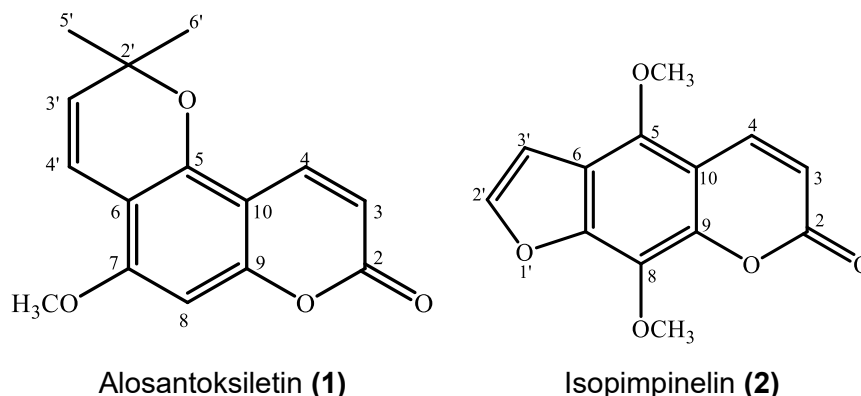
Sampel buah *Melicope latifolia* T.G. Hartley berasal dari Kawasan Konservasi Karang Asem, Bali, Indonesia. Sampel tumbuhan diidentifikasi di Herbarium Bogoriensis, Jawa Barat.

Ekstraksi dan Isolasi

Serbuk kering buah *M. latifolia* (0,5 kg) diekstraksi dengan metanol dalam suhu ruang selama tiga hari. Proses ekstraksi dilakukan sebanyak tiga kali dengan perlakuan kondisi yang sama. Pelarut metanol diuapkan dengan alat rotavapor vakum menghasilkan *crude* ekstrak MeOH coklat kehitaman. Senyawa nonpolar yang terdapat dalam ekstrak MeOH dipartisi dengan *n*-heksana menggunakan corong pisah. Proses partisi dengan *n*-heksana terhadap ekstrak MeOH dilakukan sebanyak tiga kali dengan perbandingan volume 1:1. Penambahan asam sitrat 5% terhadap ekstrak MeOH sisa bertujuan untuk menggaramkan senyawa alkaloid yang terdapat dalam ekstrak metanol yang tidak dapat terekstrak dengan pelarut semipolar seperti etil asetat (EtOAc) (Tjahjandarie *et.al.*, 2020; Saputri *et.al.*, 2018). Fasa asam dipartisi dengan EtOAc sebanyak tiga kali. Penguapan pelarut dengan rotavapor vakum diperoleh ekstrak EtOAc sebanyak 21 g. Pemisahan ekstrak etilasetat (20 g) menggunakan KKG dengan fasa gerak *n*-heksana: EtOAc (19:1, 4:1 dan 7:3) diperoleh tiga fraksi yakni A, B dan C. Pemisahan fraksi B (975 mg) menggunakan KKG dengan eluen

yang sama diperoleh tiga subfraksi B₁-B₃. Pemurnian sub fraksi B₃ (105 mg) dengan PKR menggunakan fasa diam silika gel 60 PF₂₅₄ dengan fasa gerak *n*-heksana:aseton yang kepolarannya dinaikkan secara gradient (19:1 sampai 8:2) didapatkan alosantoksiletin (**1**) sebanyak 13 mg. Pemisahan fraksi C (625 mg) dengan KKG menggunakan fasa gerak

campuran *n*-heksana:EtOAc yang kepolarannya ditingkatkan (9:1 sampai 3:1) diperoleh subfraksi C₁ dan C₂. Pemurnian sub fraksi C₂ (89 mg) menggunakan PKR dengan fasa gerak *n*-heksana:CHCl₃ (19:1 ke 7:3) diperoleh isopimpinelin (**2**) sebanyak 9 mg. Struktur senyawa turunan kumarin disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Senyawa alosantoksiletin (**1**) dan isopimpinelin (**2**)

Uji Aktivitas Antikanker

Sitotoksik senyawa **1-2** menggunakan kolorometri MTT assay diuji terhadap sel P-388 (kanker leukemia). Sel P-388 terlebih dahulu dikulturkan dalam media RPMI. Sel P-388 yang mengandung 1×10^5 sel diinkubasi ditambahkan dengan senyawa uji dalam berbagai konsentrasi (1; 3, 10, 30, 100 $\mu\text{g/mL}$) didiamkan di inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C selama dua hari. Evaluasi pertumbuhan sel diamati dengan penambahan MTT dan diamati perubahan warna menghasilkan kristal formazan. Perubahan warna pada garam MTT sangat signifikan dengan total sel hidup. Kristal yang terbentuk kemudian dilarutkan dengan dimetil sulfoksida (DMSO) lalu diidentifikasi menggunakan *micro plate reader* pada panjang gelombang λ 570 nm (Tanjung *et.al.*, 2020; Saputri *et.al.*, 2018).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Senyawa alosantoksiletin (**1**) memperlihatkan titik leleh t.l. sebesar 108-110 °C. Alosantoksiletin (**1**) mempunyai puncak ion molekul $[M+H]^+$ di m/z 259,0979 dengan rumus formula C₁₅H₁₅O₄ dari hasil pengukuran spektrum massa resolusi tinggi (HRESIMS). Alosantoksiletin (**1**) dalam MeOH terlihat pada λ_{maks} nm (log ϵ): 224 (4,14); 282 (4,11); dan 324 nm (3,92). spesifik untuk turunan kumarin pada spektrum UV-Vis (Tanjung *et.al.*, 2016). Gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa **1** dalam KBr memperlihatkan adanya C=O terkonyugasi di 1735 cm⁻¹, C=C dari aromatik di 1610-1568 cm⁻¹ dan eter di 1122 cm⁻¹. Spektrum ¹H-NMR alosantoksiletin (**1**) dalam CDCl₃ terdiri dari satu proton aromatik, sepasang proton *cis*-vinilik dari α,β -keton tak jenuh, proton cincin piran dan satu proton

metoksi. Proton aromatik terlihat pada pergeseran kimia δ_H 6,35 (1H, s, H-8) dan sepasang proton *cis*-vinilik pada δ_H 7,96 (1H, *d*, $J = 9,6$ Hz, H-4) dan δ_H 6,16 (1H, *d*, $J = 9,6$ Hz, H-3) mengindikasikan bahwa senyawa **1** adalah senyawa turunan kumarin. Sinyal proton cincin piran terdiri sepasang *cis*-vinilik pada δ_H 6,61 (1H, *d*, $J = 9,9$ Hz, H-4') dan δ_H 5,55 (1H, *d*, $J = 9,9$ Hz, H-3') serta satu sinyal proton *gem* dimetil pada δ_H 1,46 (6H, s, H-5'/H-6'). Satu sinyal proton metoksi yang terikat pada inti aromatik terlihat pada δ_H 3,87 (3H, s, 7-OCH₃). Spektrum ¹³C-NMR alosantoksiletin (**1**) menunjukkan 14 sinyal atom karbon dari 15 karbon total. Pengurangan satu sinyal karbon disebabkan adanya karbon *gem* dimetil yang simetris. Karbon alosantoksiletin (**1**) terdistribusi atas tujuh sinyal karbon kuarterner (δ_C 161,6; 158,3; 155,9; 150,3; 106,6; 103,8 dan 77,8), lima sinyal karbon metin (δ_C 138,7; 127,6; 116,1; 111,2; 91,6) dan dua sinyal karbon metil (δ_C 28,0, 56,0). Penetapan posisi metoksi dan cincin pirano pada senyawa **1** ditetapkan berdasarkan pengukuran 2D NMR. Sinyal *cis* vinylic di H-4 (δ_H 7,96) memperlihatkan hubungan dua dan tiga ikatan dengan C-2 (δ_C 161,6), C-5 (δ_C 150,3) dan C-9 (δ_C 155,9) pada spektrum HMBC (Tabel 1), . Hasil korelasi ini menempatkan kedudukan karbon oksiaril di C-5. Sinyal *cis* vinylic lainnya di δ_H 6,16 (H-3) berhubungan dengan C-2 dan C-10 (δ_C 103,8). Sinyal substituen metoksi di δ_H 3,87 (7-OCH₃) berhubungan dengan sinyal karbon

oksiaril di C-7 (δ_C 158,3). Proton aromatik di H-8 (δ_H 6,35) berhubungan dengan C-6 (δ_C 106,6), C-7, C-9 dan C-10. Hasil korelasi tersebut mengarahkan kedudukan metoksi di C-7. Dengan demikian cincin pirano terhubung pada C-5 dan C-6. Hasil analisis 1D dan 2D NMR menunjukkan senyawa **1** adalah alosantoksiletin (Amaro-Luis, *et al.*, 1990). Spektrum HMBC yang menunjang struktur kimia alosantoksiletin ditampilkan di Tabel-1 serta Gambar-2.

Senyawa isopimpinellin (**2**) memperlihatkan titik leleh t.l. sebesar 147-148°C. Spektrum HRESIMS isopimpinellin (**2**) memperlihatkan puncak ion massa molekul [M+H]⁺ di m/z 247,0609, mendukung rumus formula C₁₃H₁₁O₅. Spektrum UV-Vis isopimpinellin (**2**) (MeOH) λ_{maks} nm (log ϵ): 223 (4,20); 241 (4,00); 248 (4,00); 268 (4,09) dan 311 nm (3,91) merupakan ciri senyawa turunan furokumarin (Tanjung *et.al.*, 2016). Gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa **2** memperlihatkan gugus fungsi yang sama dengan senyawa **1** yakni pada ν_{maks} 1751 cm⁻¹, 1606-1491 cm⁻¹ dan 1145 cm⁻¹ pada spektrum IR. Spektrum ¹H-NMR senyawa **2** dalam CDCl₃ terdiri dari sepasang proton *cis*-vinilik dari α,β -keton tak jenuh, proton cincin furan dan dua proton metoksi. Sinyal proton *cis*-vinilik terlihat pada δ_H 8,12 (1H, *d*, $J = 9,8$ Hz, H-4) dan δ_H 6,29 (1H, *d*, $J = 9,8$ Hz, H-3) yang mirip dengan senyawa **1**.

Tabel 1. Data NMR alosantoksiletin dalam CHCl₃ terdeuterasi

No.C	δ_H (multiplisitas, konstanta kopling dalam Hz)	δ_C	HMBC
1	-	-	-
2	-	161,6	-
3	6,16 (<i>d</i> , 9,6)	111,2	C-2; C-10
4	7,96 (<i>d</i> , 9,6)	138,7	C-2; C-5; C-9
5	-	150,3	-
6	-	106,6	-
7	-	158,3	-
8	6,35 (<i>s</i>)	91,6	C-6; C-7; C-9; C-10
9	-	155,9	-
10	-	103,8	-
1'	-	-	-
2'	-	77,8	-
3'	5,55 (<i>d</i> , 9,9)	127,6	C-6, C-2'
4'	6,61 (<i>d</i> , 9,9)	116,1	C-5, C-2'
5'	1,46 (<i>s</i>)	28,0	C-2', C-3', C-6'
6'	1,46 (<i>s</i>)	28,0	C-2', C-3', C-5'
7-OCH ₃	3,87 (<i>s</i>)	56,0	C-7

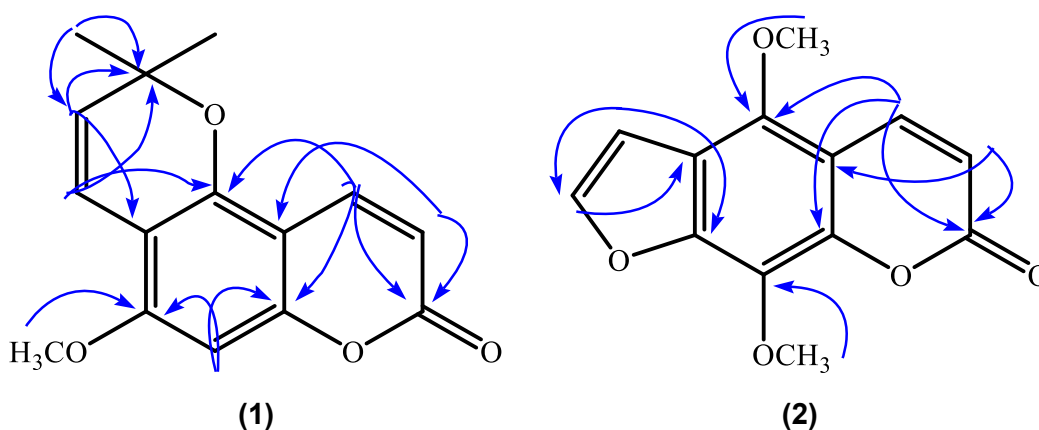
Sepasang sinyal alkena dari cincin furan terlihat pada δ_H 7,62 1H, *d*, $J = 2,3$ Hz, H-2') dan 7,00 (1H, *d*, $J = 2,3$ Hz, H-3'). Dua buah sinyal metoksi yang terikat pada inti aromatik terlihat pada δ_H 4,17 (8-OCH₃) dan δ_H 4,16 (5-OCH₃). Spektrum ¹³C-NMR isopimpinellin (**2**) terdistribusi 13 karbon yang terpisahkan sesuai jenis karbonnya. Penetapan posisi kedua gugus metoksi dan cincin furano isopimpinellin (**2**) ditetapkan dengan pengukuran 2D NMR. Proton *cis* vinylic di δ_H 8,12 (H-4) memperlihatkan hubungan karbon di C-2 (δ_C 160,6), C-5 (δ_C 128,3) dan C-9 (δ_C 143,8) pada spektrum HMBC (Tabel 1), . Sinyal proton metoksi pada δ_H 4,16 (5-OCH₃) berkorelasi dengan karbon C-5. Hasil korelasi ini menunjukkan adanya karbon metoksi di C-5. Sinyal alkena cincin furan di δ_H 7,62 (H-2') berkorelasi dengan C-6 (δ_C 114,8), C-7 (δ_C 150,1) dan C-3' (δ_C 105,2). Sinyal alkena

cincin furan lainnya pada δ_H 7,00 (H-3') berkorelasi dengan C-7 dan C-2' (δ_C 139,5). Korelasi dua dan tiga ikatan ini menegaskan kedudukan cincin furan terhubungkan pada C-6 dan C-7 serta metoksi di C-8. Kombinasi analisis UV, IR, HRESIMS, dan NMR. struktur kimia isopimpinellin dapat diprediksi (Siridechakorn *et.al.*, 2012). Spektrum HMBC yang menunjang struktur kimia isopimpinellin ditampilkan di Tabel 2 serta Gambar 2.

Sitotoksik alosantoksiletin (**1**) dan isopimpinellin (**2**) terhadap sel P-388 berdasarkan metode MTT. Senyawa alosantoksiletin (**1**) mempunyai nilai IC₅₀ = 3,41 ± 0,31 µg/mL dengan kategori aktivitas moderat. Senyawa isopimpinellin (**2**) memperlihatkan nilai IC₅₀ sebesar 23,70 ± 1,37 µg/mL dan dikategorikan lemah (Tjahjandarie, 2019).

Tabel 2. Data NMR isopimpinelin

No.C	δ_H (multiplisitas, konstanta kopling dalam Hz)	δ_C	HMBC
1	-	-	-
2	-	160,6	-
3	6,29 (d, 9,8)	112,9	C-2; C-10
4	8,12 (d, 9,8)	145,2	C-2; C-5, C-9
5	-	128,3	-
6	-	114,8	-
7	-	150,1	-
8	-	144,4	-
9	-	143,8	-
10	-	107,7	-
1'	-	-	-
2'	7,62 (d, 2,3)	139,5	C-6; C-7, C-3'
3'	7,00 (d, 2,3)	105,2	C-7, C-2'
5-OCH ₃	4,16 (s)	61,8	C-5
8-OCH ₃	4,17 (s)	60,9	C-8

**Gambar 2.** HMBC yang penting pada senyawa alosantoksiletin (1) dan isopimpinelin (2)

KESIMPULAN

Dua senyawa turunan kumarin telah berhasil diperoleh dari buah *M. latifolia*. Alosantoksiletin (1) memperlihatkan aktivitas moderat dengan $IC_{50} = 3,41 \pm 0,31 \mu\text{g/mL}$ dan isopimpinelin (2) mempunyai aktivitas lemah dengan $23,70 \pm 1,37 \mu\text{g/mL}$ terhadap sel P-388.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih diucapkan kepada Bapak Ismail R. atas pengambilan dan identifikasi *M. latifolia*.

DAFTAR PUSTAKA

- Amaro-Luis, Juan, M., Massanet, Guillermo, M., Pando, Enrique., R-L, Francisco., and Zubia, E., 1990, New coumarins from *Pilocarpus goudotianus*, *Planta Media*, 56, pp.115-118.
- Chou, H-C., Chen, J-J., Duh, C-Y., Huang, T-F., and Chen, I-S., 2005, Cytotoxic and anti-platelet aggregation constituents from the root wood of *Melicope semecarpifolia*, *Planta Medicine.*, 71, pp. 1078-1081.
- Hartley, T.G., 2001, On the taxonomy and biogeography of *Euodia* and *Melicope* (Rutaceae), *Allertonia*, 8(1), pp.1-319.
- Kassim, N.K., Rahmani, M., Ismail, A., Sukari, M.A., Ee, G.C.L., Nasir, N.M., and Awang, K., 2013, Antioxidant activity-guided separation of coumarins and lignan from *Melicope glabra* (Rutaceae), *Food Chem.*, 139, pp.87-92.
- Nakashima, K., Oyama, M., Ito, T., Witono, J.R., Darnaedi, D., Tanaka, T., Murata, J., and Inuma, M., 2012. Melicodenines A and B, novel diels-alder type adducts isolated from *Melicope denhamii*, *Tetrahedron*, 52(36), pp.4694-4696.
- Saputri, R.D., Tjahjandarie, T.S., and Tanjung, M., 2019. Two novel coumarins bearing an acetophenone derivative from the leaves of *Melicope quercifolia*. *Nat. Prod. Res.* 1-6, <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1644634>.
- Saputri, R.D., Tjahjandarie, T.S., and Tanjung, M., 2018. Meliglabin, a new flavonol derivative from the leaves of *Melicope glabra* (Blume) T.G. Hartley. *Nat. Prod. Sci.*, 24, pp.155-158.
- Saputri R.D., Tjahjandarie T.S., and Tanjung, M., 2019. Alkaloid furokuinolin dan asam sinamat ter-O-geranilasi dari kulit batang *Melicope hookeri* T.G. Hartley. *J Sains Kesehatan*. 2 (1), pp.1-7.
- Sridechakorn, I., and Laphookhieo, S., 2012, Chemical constituents from *Feronia Limonia* roots, *Chemistry of Natural Compounds*, 48(2), pp.2-4.
- Tanjung, M., Tjahjandarie, T.S., Saputri, R.D., Aldin, M.F., and Purnobasuki, H., 2020. Two new pyranoxanthones from the stem bark of *Calophyllum pseudomolle* P.F. Stevens, *Nat. Prod. Res.*: 1-6, <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1808638>.
- Tanjung M, Fitriati F.F., Saputri D.S., and Tjahjandarie T.S., 2016. Antimalarial and antioxidant of isoprenylated coumarins from the stem bark of *Mesua borneensis* L. *J Biol Active Prod from Nature*. 6, pp.95-100.
- Tjahjandarie, T.S., Tanjung, M., Saputri, R.D., Nadar, P.B., Aldin, M.F., Marlina, E., and Permadi, A., 2019. Flavestins K, An isoprenylated stilbene from the leaves of *Macaranga recurvata* Gage, *Nat. Prod. Sci.*, 25(3), pp.244-247.
- Tjahjandarie, T.S., Tanjung, M., Saputri, R.D., Rahayu, D.O., Gunawan, A.N.I., and Aldin, M.F., 2020. Two new 2-arylbenzofurans from *Sesbania grandiflora* L. and their cytotoxicity towards cancer cells, *Nat. Prod. Res*, pp.1-6,, <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1821016>.
- Xu, J., Sun, X., Liu, X., Peng, M., Li, S., Jin, D.-Q., Lee, D., Bartlam, M., and Guo, Y., 2016, Phytochemical constituents from *Melicope pteleifolia* that promote neurite outgrowth in PC12 cells, *J Funct. Foods*, 23, pp.565-572.