

EFEK SENYAWA FLAVONOIDS DARI KEMUNING (*Murraya paniculata* [L.] Jack.) TERHADAP PELEPASAN HISTAMIN DARI KULTUR SEL MAST

EFFECTS OF FLAVONOIDS ISOLATED FROM ORANGE JASMINE (*Murraya paniculata* [L.] Jack.) ON HISTAMINE RELEASE FROM MAST CELLS

Agung Endro Nugroho^{1*}, Sugeng Riyanto², Mohamad Aspollah Sukari³, dan Kazutaka Maeyama⁴

¹. Department of Pharmacology and Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Gadjah Mada University

². Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Gadjah Mada University

³. Department of Chemistry, Faculty of Science, Universiti Putra Malaysia, Selangor 43400, Malaysia.

⁴. Department of Pharmacology, Informational Biomedicine, Ehime University Graduate School of Medicine, Shitsugawa, Toon-shi, Ehime 791-0295, Japan;

ABSTRAK

Murraya paniculata [L.] Jack. merupakan tanaman yang tumbuh di Indonesia, dikenal dengan nama Kemuning. Penelitian mengenai tanaman ini telah banyak dilakukan, terutama isolasi senyawa aktifnya. Tanaman ini mempunyai kandungan senyawa aktif, diantaranya senyawa turunan flavonoid. Pada penelitian, tiga senyawa flavonoid yang diisolasi dari *M. paniculata* diuji aktivitasnya terhadap pelepasan histamin dari kultur sel mast yaitu sel RBL-2H3. Ketiga senyawa tersebut adalah 3,3',4',5,5',7-heksametoksiflavin; 3,3',4',5,5',6,7-heptametoksiflavin; dan 3,3',4',5,5',6,7,8-oktametoksiflavin. Induktor pelepasan histamin yang digunakan adalah DNP₂₄-BSA dan thapsigargin. Keduanya berturut-turut menginduksi secara imunologis dan non-immunologis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa heptametoksiflavin dan heksametoksiflavin cenderung tidak mempengaruhi pelepasan histamin dari sel mast. Namun, oktametoksiflavin dapat meningkatkan pelepasan histamin dari sel mast baik tanpa induksi maupun terinduksi dengan DNP₂₄-BSA atau thapsigargin. Senyawa tersebut mampu meningkatkan pelepasan histamin hingga 50%. Dari hasil tersebut, penambahan gugus polimetoksi pada struktur flavonoid berpotensi dapat menghasilkan efek pelepasan histamin dari sel mast.

Key words: flavonoid, *Murraya paniculata*, histamine, sel mast

ABSTRACT

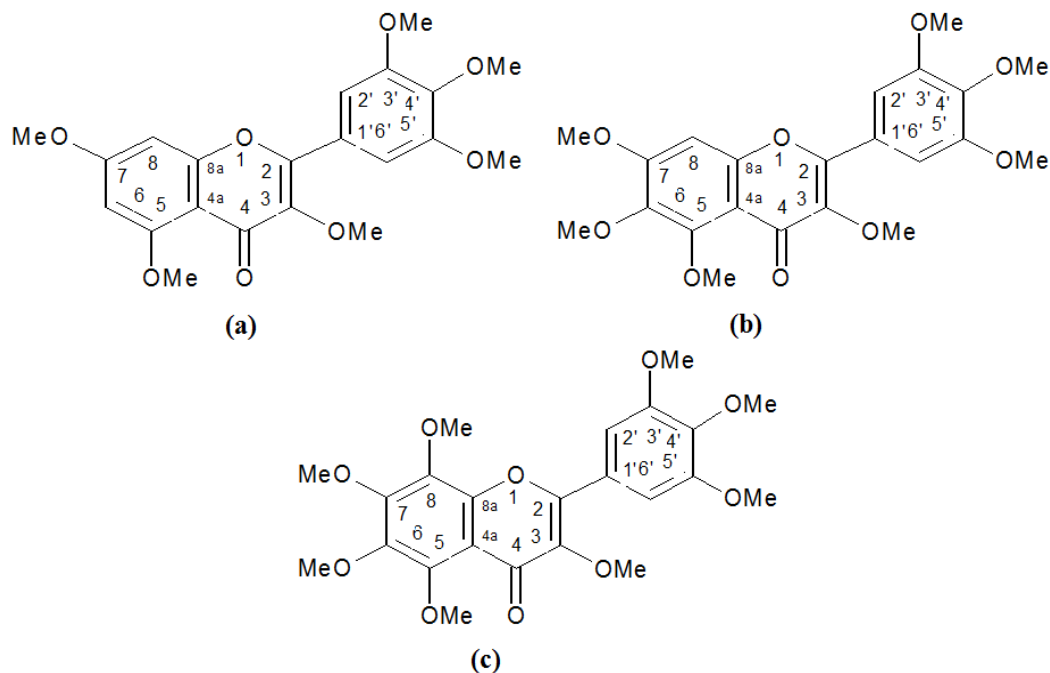
Murraya paniculata [L.] Jack. (Kemuning) is a plant that grows widely in some areas of Indonesia. Studies related to this plant have been widely explored especially isolation of its active compounds. The plant contents several active compounds such as flavonoids. In the study, three flavonoid isolated from *M. paniculata* were evaluated for their effect on histamine release from mast cells (RBL-2H3 cells). These compounds were 3,3',4',5,5',6,7,8-octamethoxyflavone; 3,3',4',5,5',6,7-heptamethoxyflavone and 3,3',4',5,5',7-hexamethoxyflavone. The histamine inducers used in the study were DNP₂₄-BSA dan thapsigargin, inducing the histamine release immunologically and non-immunologically, respectively. In the study, heptamethoxyflavone and hexamethoxyflavone did not influence the histamine release from mast cells significantly. However, octamethoxyflavone could increase the histamine release from RBL-2H3 cells in absence and presence the histamine inducers. The flavonoid could increase the release of histamine up to 50%. Based on the results, polymethoxy moieties at the structure of flavonoid have a significant role to emerge the histamine-release stimulating effect from mast cells.

Key words: flavonoid, *Murraya paniculata*, histamine, mast cells

*Korespondensi : Agung Endro Nugroho, M.Si., Ph.D.
Bagian Farmakologi Fakultas Farmasi UGM
Email : agungendronugroho@yahoo.com

PENDAHULUAN

Murraya paniculata [L.] Jack. (Kemuning) merupakan pohon perdu, tumbuh liar di semak belukar ataupun di hutan, dan secara luas tumbuh di negara India, Asia Tenggara, China bagian selatan, Taiwan dan kepulauan Okinawa (Kinoshita *et al.*, 1989). Tumbuhan ini termasuk dalam familia Rutaceae. *M. paniculata* merupakan tumbuhan yang digunakan sebagai obat



Gambar 1. Struktur kimia senyawa flavonoid diisolasi dari *M. paniculata*, 3,3',4',5,5',7-heksametoksiflavin (a), 3,3',4',5,5',6,7-heptametoksiflavin (b), dan 3,3',4',5,5',6,7,8-oktametoksiflavin (c).

tradisional misalnya sebagai pematil rasa (anestesi), sedatif, anti-inflamasi, anti-reumatik, penghilang bengkak dan anti-tiroid. Di China, *M. paniculata* dan *M. exotica* digunakan secara tradisional untuk pengobatan sakit kepala, sakit gigi, nyeri perut, influenza, reumatik, luka traumatik, dan luka gigitan serangga. Bagian tanaman yang digunakan adalah daun, kulit batang maupun buahnya (Kong *et al.*, 1986).

M. paniculata mempunyai banyak kandungan senyawa kimia antara lain : yuehchukene; sibiricin; mexotacin; 5,7-dimetoksi-8-(3-metil-2-okso-butil) kumarin; murrangatin; murrangatin ester; murralongin; scopoletin; edulitin; metil *N*-metil anthranilat; 3',4',5',5,7-pentametoksiflavin; 3',4',5,5',7,8-heksametoksiflavin (Kong *et al.*, 1986; Imai *et al.*, 1989). Ferracin *et al.* (1998) melaporkan sembilan senyawa flavonoid yang diisolasi dari buah segar *M. paniculata*. Kesembilan senyawa tersebut adalah :

5-Hidroksi-3,3',4',5',7,8,-heksametoksiflavin; 8-hidroksi-3,3',4',5,5',7-heksametoksiflavin; 3,3',4',5,7,8-heksametoksiflavin; 3',4',5,5',7-pentametoksiflavin; 3',4',5,5',6,7- heksametoksiflavin; 3,3',4',5,5',6,7-heptametoksiflavin; 3',4',5,5',7,8-heksametoksiflavin; 3,3',4',5,5',7,8,-heptametoksiflavin dan 5-hydroxy-3, 3',4',7,8- pentametoksiflavin. Penemuan ini juga didukung temuan ilmiah oleh Riyanto (2003). Kulit batang *M. paniculata* mempunyai kandungan kimia senyawa flavonoid yaitu senyawa flavon termetilasi. Senyawa tersebut yaitu 3,3',4',5,5',6,7,8-oktametoksiflavin;

3,3',4',5,5',6,7-heptametoksiflavin; dan 3,3',4',5,5',7-heksametoksiflavin. Sedangkan daun *M. paniculata* mempunyai kandungan kimia : 3,3',4',5,5',7-heksametoksiflavin dan 3',4',5,5',7-pentametoksiflavin.

Dari informasi ilmiah di atas, salah satu aktivitas farmakologi tanaman *M. paniculata* adalah anti-inflamasi. Reaksi inflamasi melibatkan peran mediator inflamasi yaitu histamin, prostaglandin, tromboksan. Pada penelitian, senyawa flavonoid dari tanaman *M. paniculata* diuji pengaruhnya terhadap pelepasan histamin dari kultur sel RBL-2H3. Apabila senyawa tersebut menghambat pelepasan histamin maka berpotensi dikembangkan sebagai obat antialergi. Namun, jika memodulasi pelepasan histamin dari sel mast maka berpotensi sebagai alergen.

METODOLOGI

Bahan.

Bahan uji utama yaitu senyawa flavonoid yang diisolasi dari *M. paniculata* yang diperoleh dari daerah Yogyakarta, Indonesia. Senyawa tersebut adalah 3,3',4',5,5',7-heksametoksiflavon; 3,3',4',5,5',6,7-heptametoksiflavon; dan 3,3',4',5,5',6,7,8-oktametoksiflavon. Penetapan struktur molekul dari kedua senyawa tersebut dilakukan di *Faculty of Science and Environmental Studies* (Universiti Putra Malaysia). Isolasi dan penetapan struktur tersebut dikerjakan oleh Dr. Sugeng Riyanto (Bagian Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi UGM).

Bahan uji lainnya yaitu dinitrophenylated bovine serum albumin (DNP₂₄-BSA) dari Bethesda, MD, sedangkan monoklonal imunoglobulin E diperoleh dari Department of Pharmacology, School of Medicine, Ehime University. Bahan lainnya adalah medium MEM and antibiotika (kombinasi natrium penisilin G dan streptomisin sulfat) (Grand Island, NY), fetal calf serum (JRH Biosciences), PIPES (Dosindo, Kumamoto Japan).

Cara kerja.

Preparasi sel RBL-2H3

Sel RBL-2H3 yang disensitisasi dengan monoklonal IgE sehari sebelumnya, dipreinkubasi dengan PIPES (sebagai kontrol) atau larutan senyawa uji dalam PIPES (konsentrasi 1, 10 atau 100 μ M) sebanyak 180 μ L selama 10 menit pada suhu 37 °C. Kemudian, ditambahkan larutan penginduksi histamin release, DNP₂₄-BSA 200 ng/mL atau thapsigargin 5 μ g/mL, sebanyak 20 μ L tiap sumuran untuk kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Plate disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 3000 rpm, dan supernatan sebanyak 50 μ L dipindah ke tube 1,5 mL. Supernatan ditambahkan asam perklorat 3 % sebanyak 250 μ L, dan di-mixer. Kemudian, ditambahkan larutan KOH 2M/ KH₂PO₄ 1 M sebanyak 30 μ L, dicampur, kemudian disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C. Supernatan siap ditetapkan kadar histaminnya. Untuk penetapan histamin total, sebanyak 350 μ L larutan dapar PIPES ditambahkan pada 6 sumuran, kemudian disonifikasi. Larutan homogenat sel siap dilakukan penetapan kadar histamin.

Penetapan kadar histamin

Kadar histamin ditetapkan dengan menggunakan HPLC dengan detektor fluorometri mengacu pada metode Yamatodani (1985).

Sebanyak 50 μ L supernatan dan homogenat sel diinjeksikan pada kolom TSKgel SP-2SW cation Exchanger (Tosoh, Tokyo). Fase gerak HPLC yang digunakan adalah : larutan dapar kalium fosfat 0,25 M dan larutan o-phthalaldehyde dalam kondisi alkali. Deteksi fluorometri dilakukan pada panjang gelombang eksitasi 360 nm dan emisi 450 nm.

Analisa data

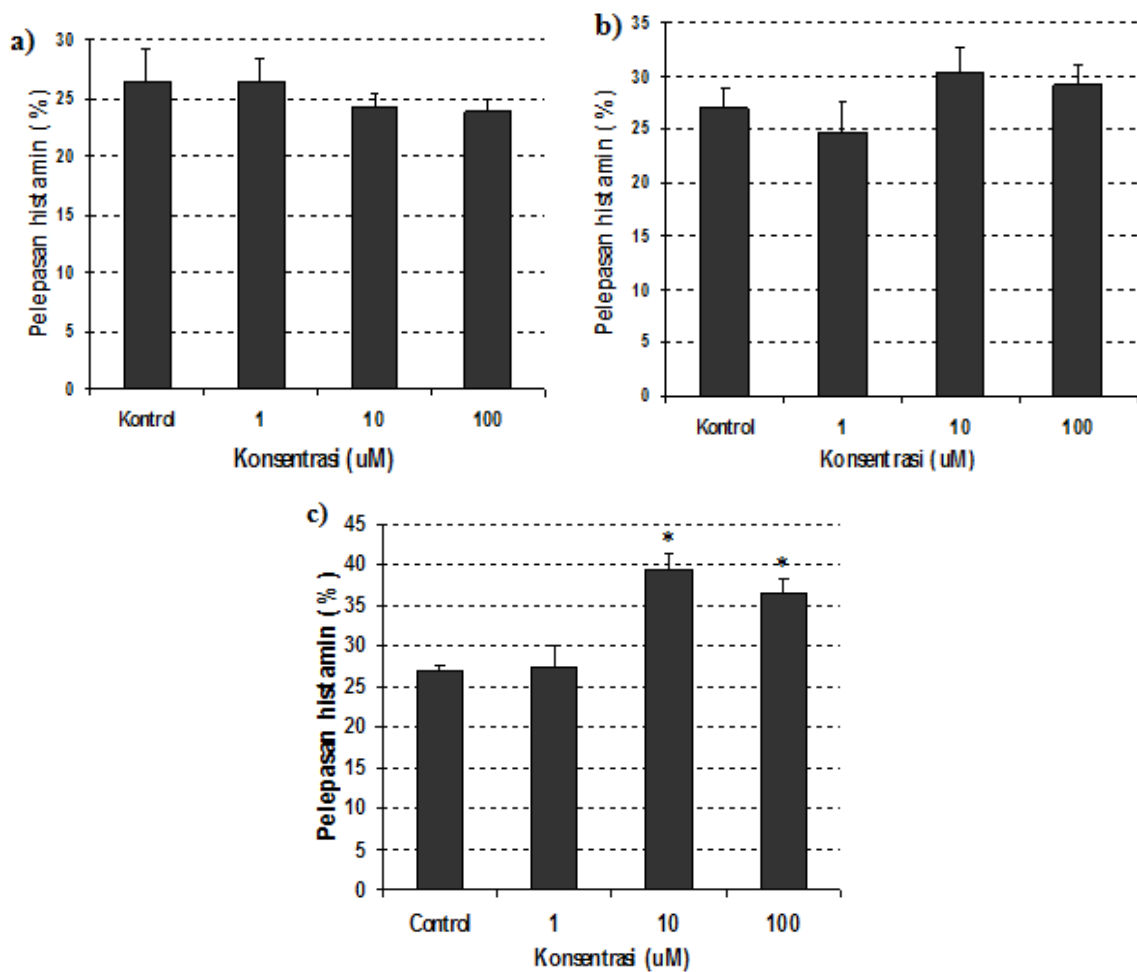
Data penelitian yang disajikan dalam bentuk prosentase pelepasan histamin. Nilai tersebut merupakan kadar histamin yang dilepaskan oleh sel mast dalam medium dibagi dengan kadar histamin dalam sel mast (*total histamine content*), kemudian dikalikan seratus persen. Semua data disajikan dalam bentuk mean \pm SEM. Analisa statistika menggunakan *one-way analysis of variance* (ANOVA), dilanjutkan dengan uji Least Significant Difference (LSD). Tingkat kepercayaan yang digunakan adalah 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Efek pada pelepasan histamin diinduksi antigen

Pada penelitian ini, pemberian DNP₂₄-BSA 20 ng/mL menginduksi pelepasan histamin dari sel RBL-2H3 sebesar 26,39 \pm 2,75 %. Pemberian senyawa flavonoid dari *M. paniculata* menunjukkan pengaruh yang sedikit beragam namun mempunyai korelasi (Gambar 2). Flavonoid heksametoksiflavon cenderung tidak mempengaruhi pelepasan histamin dari sel RBL-2H3 (P>0,05), meskipun pada konsentrasi 100 μ M sedikit menghambat pelepasan histamin (Gambar 2a). Flavonoid heptametoksiflavon juga tidak mempengaruhi pelepasan histamin dari sel RBL-2H3 (P>0,05), namun dari profil kurva gambar 2b, heptametoksiflavon cenderung mempotensiasi pelepasan histamin. Di lain pihak, flavonoid oktametoksiflavon meningkatkan pelepasan histamin dari sel RBL-2H3 secara bermakna (P<0,05), dan efeknya tergantung konsentrasi (*dose-dependent manner*). Oktametoksiflavon konsentrasi 10 dan 100 μ M meningkatkan pelepasan histamin masing-masing sebesar 47,58 \pm 7,02% dan 36,25 \pm 5,97% (Gambar 2c).

Efek pada pelepasan histamin diinduksi thapsigargin



Gambar 2. Histogram pengaruh pemberian senyawa flavonoid dari *M. paniculata* terhadap pelepasan histamin dari kultur sel mast yaitu sel RBL-2H3 dengan induksi DNP₂₄-BSA 20 ng/mL.

(a). 3,3',4',5,5',7-heksametoksiflavon;

(b). 3,3',4',5,5',6,7-heptametoksiflavon;

(c). 3,3',4',5,5',6,7,8-oktametoksiflavon.

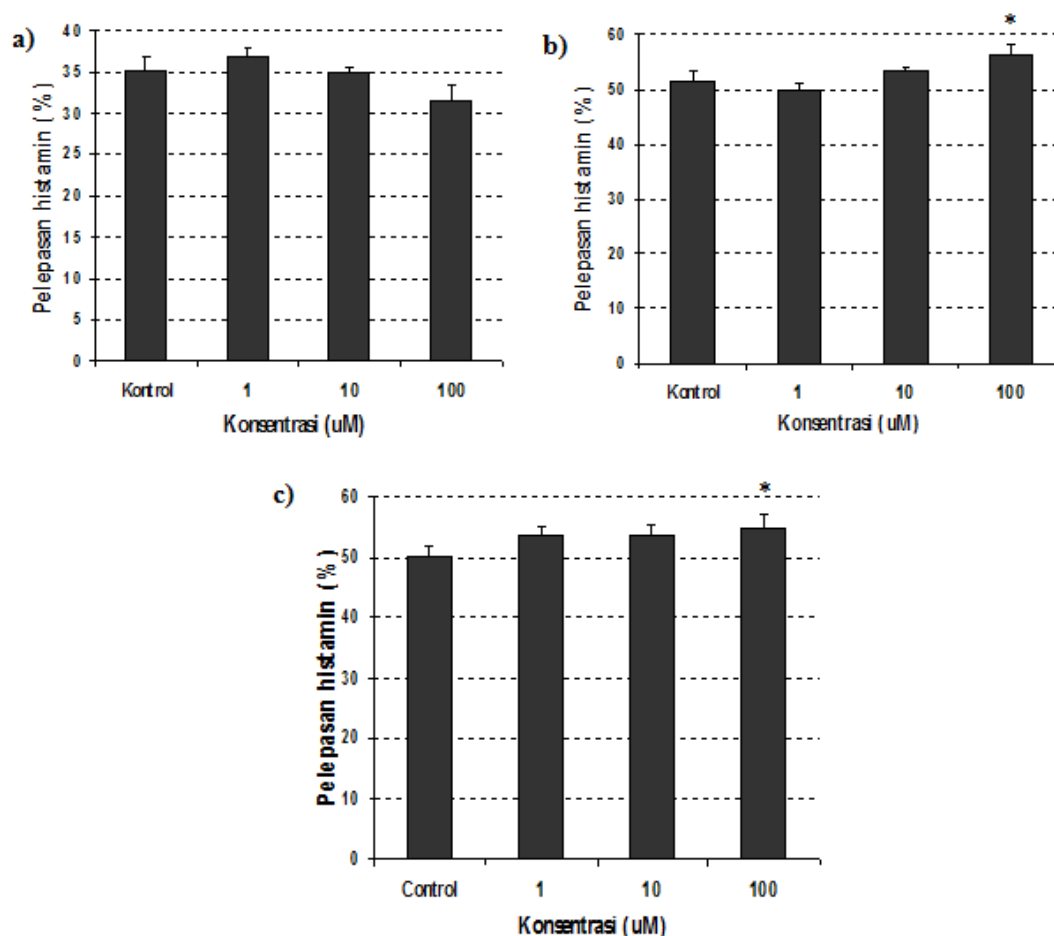
* berbeda bermakna dibandingkan kontrol (P<0,05).

Thapsigargin 5 µg/mL merangsang pelepasan histamin dari sel RBL-2H3 hingga 50 %. Hasil percobaan ini (gambar 3) mempunyai profil yang mirip dengan percobaan sebelumnya (gambar 2) bahwa senyawa flavonoid dari *M. paniculata* menunjukkan pengaruh yang sedikit beragam pada sel RBL-2H3 yang diinduksi thapsigargin. Flavonoid heksametoksiflavon cenderung tidak mempengaruhi pelepasan histamin dari sel RBL-2H3 (P>0,05) (Gambar 3a). Namun, flavonoid heptametoksiflavon dan oktametoksiflavon dapat meningkatkan pelepasan histamin dari sel RBL-2H3 secara bermakna (P<0,05), dan efeknya adalah tergantung dosis (*dose-dependent manner*). Pentametoksiflavon

konsentrasi 10 dan 100 µM meningkatkan pelepasan histamin masing-masing sebesar 3,58± 1,09% dan 9,32± 3,27% (Gambar 3b). Di lain pihak, oktametoksiflavon konsentrasi 10 dan 100 µM meningkatkan pelepasan histamin masing-masing sebesar 7,19± 3,13% dan 9,03± 8,79% (Gambar 3c).

Efek pada pelepasan histamin tanpa induksi

Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh senyawa flavonoid yang diisolasi dari *M. paniculata* terhadap pelepasan histamin dari sel RBL-2H3 tanpa adanya suatu induksi (*spontaneous histamine release*). Pemberian heksametoksiflavon dan heptametoksiflavon dapat merangsang



Gambar 3. Histogram pengaruh pemberian senyawa flavonoid dari *M. paniculata* terhadap pelepasan histamin dari kultur sel mast yaitu sel RBL-2H3 dengan induksi thapsigargin 5 µg/mL.

(a). 3,3',4',5,5',7-heksametoksiflavin

(b). 3,3',4',5,5',6,7-heptametoksiflavin

(c). 3,3',4',5,5',6,7,8-oktametoksi flavon.

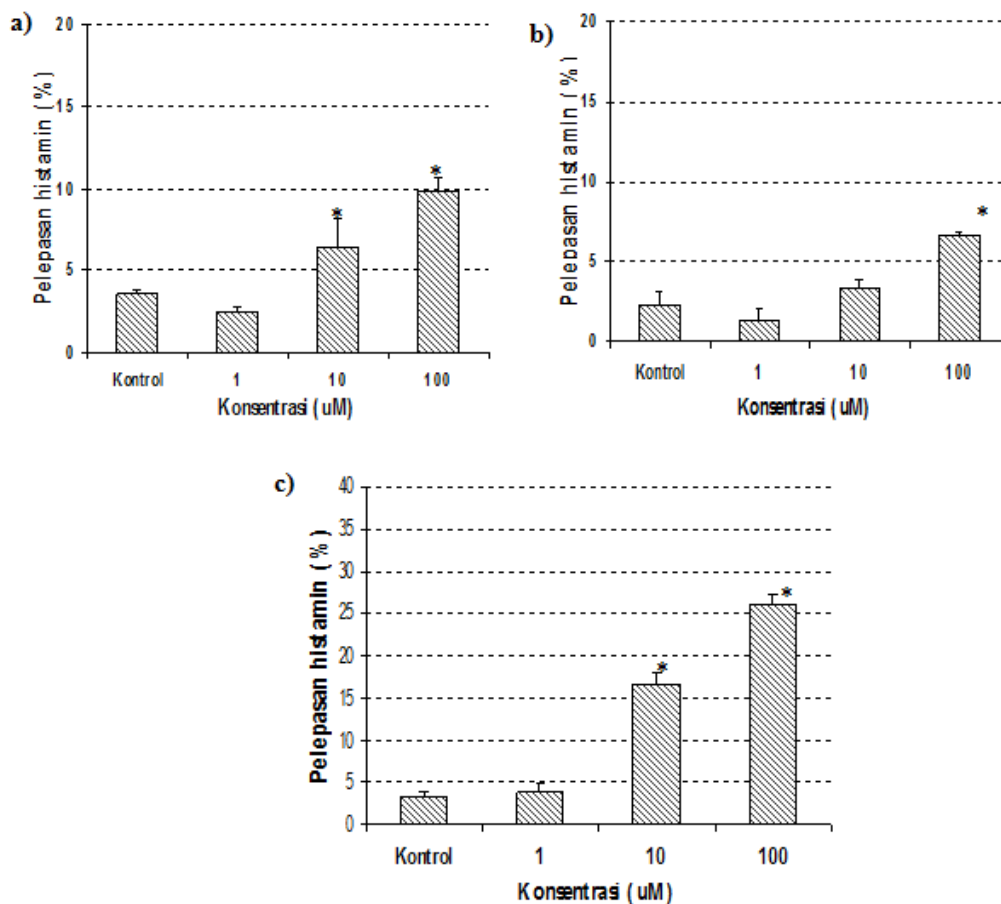
* berbeda bermakna dibandingkan kontrol ($P < 0,05$).

pelepasan histamin meskipun sangat rendah yaitu kurang dari 10 % (Gambar 4a dan 4b). Namun, pemberian oktametoksiflavin (10 dan 100 µM) merangsang pelepasan histamin dari sel RBL-2H3 lebih kuat yaitu masing-masing sebesar $16,67 \pm 1,30\%$ dan $26,05 \pm 1,23\%$ (Gambar 4c).

Diskusi hasil penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh senyawa flavonoid yang diisolasi dari *M. paniculata* terhadap pelepasan histamin dari kultur sel mast yaitu sel RBL-2H3 (*rat basophilic leukemia*), merupakan tipe sel mast mukosa. Apabila senyawa tersebut menghambat pelepasan histamin maka berpotensi dikembangkan sebagai obat antialergi. Namun, jika memodulasi

pelepasan histamin dari sel mast maka berpotensi sebagai alergen. Pada penelitian, untuk merangsang pelepasan histamin digunakan DNP₂₄-BSA dan thapsigargin. Dinitrophenylated bovine serum albumin (DNP₂₄-BSA) merupakan antigen spesifik terhadap imunoglobulin E (IgE), dapat berinteraksi dengan molekul IgE yang terikat pada reseptor FcεRI receptors secara cross-linking. Interaksi tersebut menginisiasi serangkaian proses signaling dalam sel mast, dan akhirnya menghasilkan efek pelepasan histamin dari sel mast (Metcalf *et al.* 1997; Liu *et al.*, 1980). Di lain pihak, thapsigargin beraksi dengan menghambat pompa ATP-dependent Ca²⁺ (SERCA) dari retikulum endoplasmik sehingga dapat meningkatkan konsentrasi ion kalsium



Gambar 4. Histogram pengaruh pemberian senyawa flavonoid dari *M. paniculata* terhadap pelepasan histamin dari kultur sel mast yaitu sel RBL-2H3 tanpa adanya induksi.

- (a) 3,3',4',5,5',7-heksametoksiflavon;
- (b). 3,3',4',5,5',6,7-heptametoksiflavon;
- (c). 3,3',4',5,5',6,7,8-oktametoksi flavon.

* berbeda bermakna dibandingkan kontrol ($P < 0,05$).

intraseluler. Lebih lanjut, kenaikan ion kalsium intraseluler tersebut merangsang proses eksositosis granul dan akhirnya terjadi pelepasan mediator sel mast (Patkar *et al.*, 1979; Brayden *et al.*, 1989).

Murraya paniculata [L.] Jack. dikenal di Indonesia dengan nama Kemuning. Tanaman ini mempunyai banyak kandungan senyawa kimia terutama senyawa dari golongan flavonoid. Setidaknya terdapat sembilan jenis flavonoid dalam tanaman tersebut (Ferracin *et al.*, 1998). Riyanto (2003) melaporkan bahwa pada kulit batang *M. paniculata* mempunyai kandungan kimia senyawa flavonoid yaitu 3,3',4',5,5',6,7,8-oktametoksiflavon; 3,3',4',5,5',6,7-heptametoksiflavon; dan 3,3',4',5,5',7-heksametoksiflavon. Daunnya mempunyai

kandungan kimia antara lain 3,3',4',5,5',7-heksametoksiflavon dan 3',4',5,5',7-pentametoksiflavon. Pada penelitian ini, ketiga senyawa flavonoid tersebut diuji aktivitasnya terhadap pelepasan histamin dari kultur sel mast (RBL-2H3).

Pada penelitian ini, senyawa heksametoksiflavon cenderung tidak mempengaruhi pelepasan histamin dari kultur sel mast yang diinduksi baik dengan DNP₂₄-BSA ataupun thapsigargin. Penambahan satu gugus metoksi menjadi senyawa pentametoksiflavon cenderung meningkatkan pelepasan histamin dari kultur sel mast. Penambahan satu gugus metoksi lagi menjadi oktametoksiflavon, secara bermakna mampu meningkatkan pelepasan histamin baik diinduksi DNP₂₄-BSA ataupun thapsigargin.

Oktametoksiflavin juga poten meningkatkan pelepasan histamin dari sel mast tanpa adanya. Ini mengindikasikan bahwa polimetoksi pada struktur flavonoid dapat meningkatkan pelepasan histamin dari sel mast.

Meskipun *M. paniculata* mengandung oktametoksiflavin, terbukti dapat meningkatkan pelepasan histamin dari sel mast, namun tanaman tersebut juga mengandung senyawa kimia lainnya yang diduga dapat menghambat pelepasan histamin yaitu senyawa turunan kumarin dengan substitusi O pada atom C nomer 7. Substitusi tersebut pada struktur kumarin mempunyai peranan yang sangat penting terhadap aktivitasnya sebagai penstabil sel mast (Watanabe *et al.*, 2005; Ryu *et al.*, 2001). Senyawa tersebut antara lain aurapten, gleinadien, coumurrayin, toddalenon, 5-methoxymurrayatin, sibiricin, mexoticin (Riyanto, 2003; Imai *et al.*, 1989; Kinoshita *et al.*, 1996).

KESIMPULAN

Senyawa 3,3',4',5,5',6,7-heptametoksiflavin dan 3,3',4',5,5',7-heksametoksiflavin mempunyai kecenderungan tidak mempengaruhi pelepasan histamin dari sel mast. Namun, 3,3',4',5,5', 6,7,8-oktametoksiflavin dapat meningkatkan pelepasan histamin dari sel mast baik tanpa induksi maupun terinduksi dengan DNP₂₄-BSA atau thapsigargin.

DAFTAR PUSTAKA

- Brayden, D. J., Hanley M. R., Thastrup, O., and Cuthbert, A. W., 1989, Thapsigargin, a new calcium-dependent epithelial anion secretagogue, *Br J Pharmacol.*, 98(3):809-816.
- Ferracin, R.J., Da Silva, M.F.D.G.F., Fernandes, J.B., Viera, P.C., 1998, Flavonoids from The Fruits of *Murraya paniculata*, *Phytochemistry*, 47(3): 393-396.
- Imai, F., Itoh, Kishibuchi, N., Kinoshita, T. and Sankawa, U., 1989, Constituents of the Root Bark of *Murraya paniculata* Collected in Indonesia, *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 37(1):119-123.
- Kinoshita, T., Tatara, S., Ho, F.C., Sankawa, U. 1989, 3-Prenylindole from *Murraya paniculata* and Their Biogenetic Significance, *Phytochemistry*, 28(1):147-151.

- Kinoshita, T., Wu, J.B., and Ho, F.C. 1996, Prenylcoumarins from *Murraya paniculata* var. *omphalocarpa* (Rutaceae) : The Absolute Configuration of Sibirin, Mexoticin and Omphamurin, *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 44 (6):1208-1211.
- Kong, T.C., Ng, K.H., But, P.P., Li, Q., Yu, S.X., Zang, H.T., Cheng, K.F., Soejarto, D.D., Kan, W.S., and Waterman, P.G., 1986, Source of the Anti-implantation Alkaloid Yehchukene in The Genus *Murraya*, *J. of Ethnopharmacology*, 15:195-200.
- Liu, FT., Bohn, JW., Ferry, EL., Yamamoto, H., Molinaro, CA., Sherman, LA., Klinman, NR., Katz, DH., 1980, Monoclonal dinitrophenyl-specific murine IgE antibody: preparation, isolation, and characterization, *J Immunol.*, 124(6), 2728-2737.
- Metcalf, DD., Baram, D., Mekori, YA., 1997, Mast Cells, *Physiol Rev.*, 77(4): 1033-1064.
- Patkar, S. A., Rasmussen, U., and Diamant, B., 1979, On the mechanism of histamine release induced by thapsigargin from *Thapsia garganica* L., *Agents Actions.*, 9(1):53-57.
- Riyanto S., 2003, Phytochemical Studies and Bioactivity Tests of *Murraya paniculata* Jack, *Aegle marmelos* Correa, and *Zingiber amiricans* Blume. Dissertation, Universiti Putra Malaysia.
- Ryu, S.Y., Kou, N.Y., Choi, H.S., Ryu, H., Kim, T.S. dan Kim, K.M., 2001, Cnidicin, a Coumarin, from the Root of *Angelica koreana*, Inhibits the Degranulation of Mast Cell and the NO Generation in RAW 264.7 Cells, *Planta Med.*, 67(2) : 172-174.
- Yamatodani, A., Fukuda, H., Wada, H., Iwaeda, T., Watanabe, T., 1985, High-performance liquid chromatographic determination of plasma and brain histamine without previous purification of biological samples : cation-exchange chromatography coupled with post-column derivatization fluorometry, *J Chromatogr.*, 344 : 115-123.
- Watanabe, J., Shinmoto, H. dan Tsushida, T., 2005, Coumarin and flavone derivatives from estragon and thyme as inhibitors of chemical mediator release from RBL-2H3 Cells, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69(1), 1-6