

Identifikasi senyawa antikanker dari ekstrak kloroform kulit batang *Rhizophora mucronata*

The anticancer compound identification from chloroform extract of *Rhizophora mucronata* stem bark

Hartiwi Diastuti^{1*}) dan Warsinah²

¹ Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknik, Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto

² Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto

Abstrak

Penelitian terdahulu melaporkan bahwa ekstrak kloroform hasil partisi ekstrak etanol kulit batang *R. mucronata* bersifat sitotoksik terhadap sel Myeloma (Diastuti, 2008). Penelitian ini bertujuan untuk memfraksinasi ekstrak kloroform dari kulit batang *R. mucronata* dan menguji sitotoksitasnya terhadap sel myeloma, selanjutnya mengidentifikasi senyawa kimianya. Ekstrak etanol kulit batang *R. mucronata* dipartisi dengan kloroform, kemudian difraksinasi dengan kromatografi kolom menggunakan eluen secara bergradien, berturut-turut dengan n-heksana, kloroform, etilasetat dan methanol. Hasil fraksinasi selanjutnya diuji sitotoksitasnya terhadap sel Myeloma dengan metode MTT. Fraksi yang menunjukkan sitotoksitas tertinggi diidentifikasi senyawa kimianya dengan spektrometer IR dan GCMS. Hasil penelitian menunjukkan fraksi 2b memiliki sitotoksitas tertinggi terhadap sel Myeloma dengan IC₅₀ sebesar 5,122 µg/mL. Identifikasi senyawa kimia memperlihatkan bahwa fraksi 2b mengandung 2 senyawa steroid yaitu 4- metil- kolest-24-en-3-ol dan 4-metil-stigmast-22-en-3-ol.

Kata kunci : *R. mucronata*, antikanker, sel Myeloma, steroid

Abstract

Previous reasearch reported that chloroform extract that was partitioned from etanol extracts of *R. mucronata* stem bark had sitotoxic against Myeloma cells (Diastuti, 2008). This research was aimed to fractinate the chloroform extract of *R. mucronata* stem bark and cytotoxicity test againts Myeloma cells, then identification the cytotoxic compounds. The ethanol extracts of *R. mucronata* steam bark was partitioned with chloroform. The chloroform extracts was fractinated by coloum chromatography with gradient eluent were n-hexane, chloroform, etilacetate and methanol respectively. Cytotoxicity test the fraction of chloroform extracts were conducted on Myeloma cells by MTT methods. Identification the compoud of fraction that had a highest cytotoxic againts Myeloma cells conducted using IR spectrometer, and GCMS. The result showed that 2b fraction of *R. mucronata* stem bark had a highest cytotoxic againts Myeloma cells, having IC₅₀ equal to 5.122 µg/mL. Identification of chemical compounds showed that 2b fraction contained two steroid compounds were 4 methyl- colest-24-en-3-ol and 4-methyl-stigmast-22-en-3-ol.

Key words : *R. Mucronata*, anticancer, Myeloma cells, steroids

Pendahuluan

Tumbuhan mangrove merupakan sumber bahan obat tradisional yang dapat digunakan sebagai sumber senyawa bioaktif diantaranya golongan tanin, saponin, terpenoid, alkaloid dan steroid dengan aktifitas sebagai anti

mikroba, antifungi, antivirus, antitumor, insektisida dan antileukemia (Soetarno, 2000).

Hasil penelitian sebelumnya dilaporkan bahwa ekstrak kulit batang *R. mucronata* memiliki toksisitas terhadap larva *Artemia salina* dengan LC₅₀ sebesar 301,50 µg/mL

(Diastuti, 2009). Penelitian selanjutnya menunjukkan bahwa hasil partisi ekstrak etanol kulit batang *R. mucronata* dengan kloroform dapat menghambat pertumbuhan sel kanker Myeloma dengan IC₅₀ sebesar 91,49 µg/mL (Diastuti, 2008).

Sel myeloma adalah sel kanker yang berasal dari B-sel dimana pertumbuhan tak terkendali dari sel jenis ini dapat menimbulkan beberapa macam efek seperti kerusakan tulang, gagal ginjal dan immunodeficiency (Astuti, et, al, 2005). Sel meyloma ini menyerupai sel induk yang keduanya memproduksi gamma globulin (IgG_{2b}) dengan waktu pembelahan kurang dari 17 jam (Dean,1998).

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan fraksinasi terhadap ekstrak kloroform yang bersifat sitotoksik terhadap sel kanker Myeloma dengan kromatografi kolom dan mengidentifikasi senyawa yang berpotensi sebagai antikanker. Identifikasi senyawa dilakukan secara spektrometri.

Metodologi

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah : kulit batang *R. mucronata*, kultur sel Myeloma, media RPMI, fetal bovin serum (FBS) 10% (v/v), aquades steril, DMSO, pelat KLT silika gel GF 254, reagen stopper (natrium dodesil sulfat) 10% dalam HCl), MTT 5 mg/mL dalam FBS, metanol, etil asetat, kloroform, n-heksana, etanol, dan silika gel untuk kromatografi kolom.

Alat

Peralatan yang digunakan meliputi : alat-alat gelas, tabung efendorf, autoklaf, tabung konikal steril, well plate 96 sumuran, ELISA reader SLT 340 ATC, rotaevaporator Buchi, flacon flask, neraca analitik, sentrifus, inkubator 37 °C 5% CO₂, lemari es, laminar air flow, tangki nitrogen cair, penangas air, tissue culture flask, hemocytometer, mikropipet, kolom kromatografi, spektrometer IR serta GCMS.

Jalannya Penelitian

Fraksinasi ekstrak kulit batang *R. mucronata* (Sarker, et, al., 2005 and Tantry, 2009)

Ekstrak kloroform hasil partisi ekstrak etanol kulit batang *R. mucronata* difraksinasi dengan kromatografi kolom menggunakan gradien pelarut yang ditingkatkan kepolarannya, yaitu berturut-turut dengan n-heksana, kloroform, etilasetat dan methanol. Fraksi-fraksi hasil kromatografi kolom selanjutnya diidentifikasi dengan kromatografi lapis tipis untuk melihat profil kromatogramnya. Profil kromatogram yang mirip dari

setiap fraksi digabung menjadi satu. Fraksi gabungan tersebut selanjutnya diuji sitotoksitasnya terhadap sel Myeloma. Fraksi yang menunjukkan aktivitas paling tinggi terhadap sel Myeloma selanjutnya diidentifikasi struktur kimianya dengan spektrofotometer IR dan GCMS.

Pembuatan larutan uji

Fraksi hasil kromatografi kolom yang telah di kering beku (*freeze dried*) dibuat stok 10 mg/ mL dengan dilarutkan dalam 1,25% DMSO dalam aquades steril. Selanjutnya larutan uji disaring dengan filter 0,2 µm. Dimasukkan dalam conical steril ditutup dengan parafilm, dan disimpan dalam lemari es. Kemudian dibuat seri kadar sampel dari larutan stok dalam medium RPMI 1640. Pembuatan larutan uji dilakukan di dalam laminar air flow cabinet secara aseptis.

Uji sitotoksitas dengan metode MTT (Astuti, et, al, 2005 and Mosmann, 1983)

Sebanyak 100 µL suspensi sel uji dengan kepadatan $2 \times 10^4/100 \mu\text{L}$ didistribusikan ke dalam sumuran pada 96- well plate, ditambah sampel uji pada kadar masing-masing 1000 µg/ mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL dan 62,5 µg/ mL. Sebagai kontrol digunakan 100 µL suspensi sel ditambah medium dan untuk blanko digunakan 100 µL suspensi sel ditambah DMSO 1,25% dalam medium. Selanjutnya diinkubasi 24 jam. Pada akhir inkubasi kepada sumuran ditambahkan 10 µL MTT 5 mg/mL dalam RPMI. Kemudian diinkubasi 4 jam pada suhu 37 °C. Sel uji yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu. Reaksi dengan MTT dihentikan dengan reagen stopper. kemudian diinkubasi semalam pada suhu kamar, serapan (absorbans) dibaca dengan ellisa reader pada λ 550 nm. Pengamatan jumlah kematian sel dilakukan pada jam ke 24, 48 dan 72 jam inkubasi pada suhu 37 °C setelah pemberian isolat uji dengan MTT assay.

Pengecatan DNA

Pada akhir inkubasi (jam ke 24) medium diambil, sel difiksasi dengan formaldehida kemudian ditambahkan akridin oranye 0,1%. Sel diamati di bawah mikroskop (Meiyanto, et al., 2001)

Analisis data

Data hasil uji sitotoksitas dihitung dengan rumus (Mursidi, 1985):

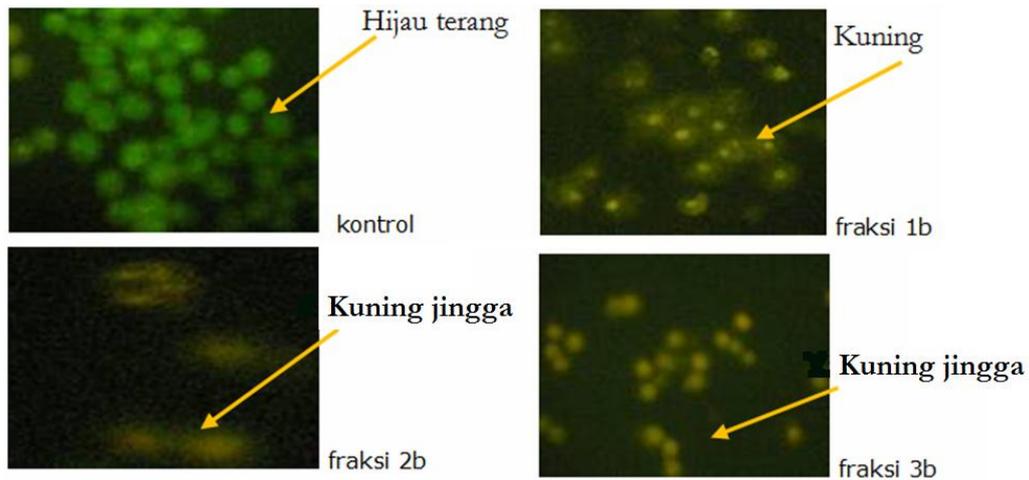
$$\% \text{ kematian sel} = \frac{(\text{abs p} - \text{abs m})(\text{abs k} - \text{abs m})}{(\text{abs k} - \text{abs m})} \times 100\%$$

abs p : absorbansi perlakuan

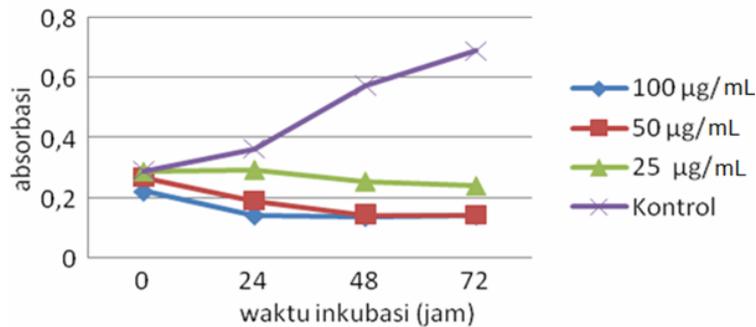
abs k : absorbansi sel kontrol

abs m : absorbansi medium

Kemudian dilanjutkan analisis dengan uji korelasi menggunakan metode probit (Finney, 1952) untuk persamaan garis regresi dan menentukan nilai IC₅₀.



Gambar 1. Hasil Pengecatan DNA sel Myeloma dengan akridin oranye setelah perlakuan sampel.



Gambar 2. Grafik pertumbuhan sel Myeloma setelah perlakuan dengan sampel pada variasi waktu.

Hasil dan Pembahasan

Fraksinasi ekstrak kloroform daun dan kulit batang *R. mucronata*

Ekstrak kloroform hasil partisi dari ekstrak etanol kulit batang *R. mucronata* (5g) difraksinasi melalui kromatografi kolom berturut-turut menggunakan pelarut n-heksana, kloroform, etilasetat dan metanol. Fraksi-fraksi yang mengandung komponen yang sama berdasarkan hasil KLT digabung, diperoleh 7 fraksi gabungan, kemudian dipilih 3 fraksi utama. Ketiga fraksi selanjutnya diuji sitotoksitasnya terhadap sel kanker Myeloma.

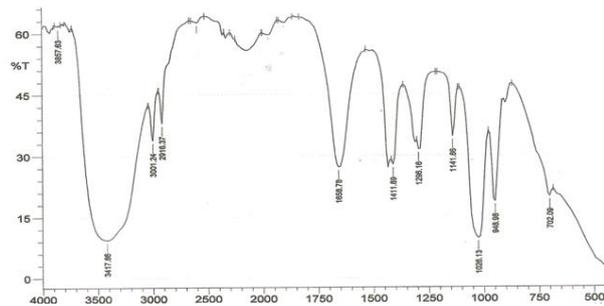
Uji sitotoksitas dan antiproliferatif terhadap sel kanker meyloma

Tingkat sitotoksitas ekstrak uji terhadap sel kanker dinyatakan pula dengan nilai IC_{50} . Hasil uji sitotoksitas terhadap sel kanker Myeloma menunjukkan ketiga fraksi yaitu fraksi

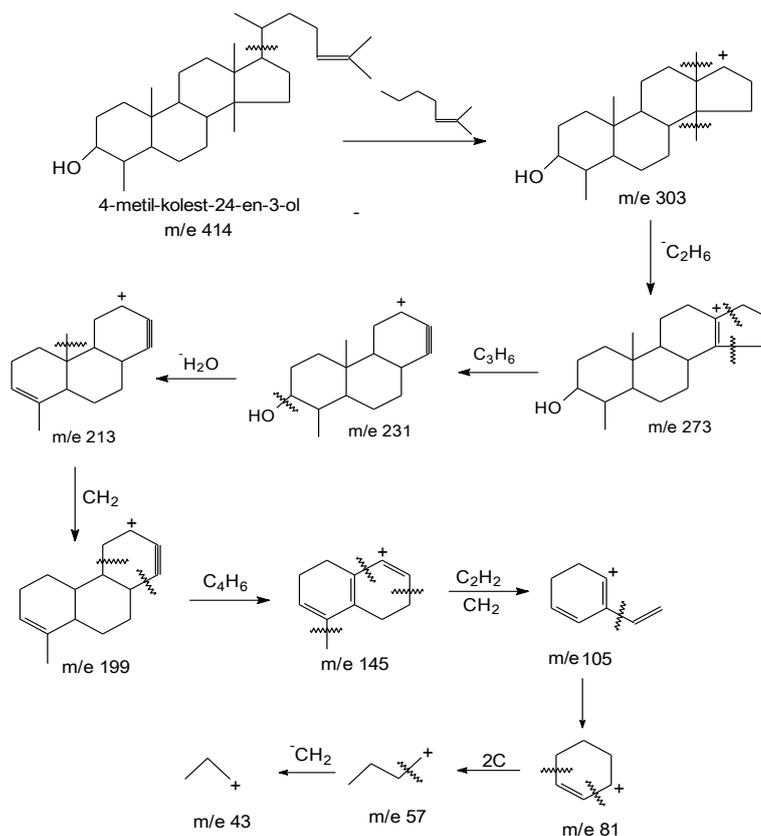
1b, fraksi 2b, dan fraksi 3b memiliki aktivitas terhadap sel Myeloma dengan nilai IC_{50} berturut-turut sebesar 34 µg/mL, 5 µg/mL dan 132 µg/mL.

Hasil pengecatan DNA (Gambar 1) menunjukkan adanya peristiwa apoptosis yang dialami oleh sel kanker Myeloma pada perlakuan dengan sampel fraksi 1b, 2b dan 3b. Hal ini diindikasikan sel berwarna kuning jingga pada perlakuan dengan sampel, sedangkan pada kontrol menunjukkan sel tetap hidup dengan sel berwarna hijau terang (Wyllie, *et al.*, 2000).

Data di atas mengindikasikan bahwa fraksi 2b kulit batang *R. mucronata* memiliki toksisitas tertinggi terhadap sel Myeloma dengan IC_{50} sebesar 5 µg/mL, dan hasil pengecatan DNA menunjukkan sel mengalami apoptosis paling akut, dengan demikian analisis selanjutnya dilakukan pada fraksi 2b.



Gambar 3. Spektrum IR senyawa 2b.

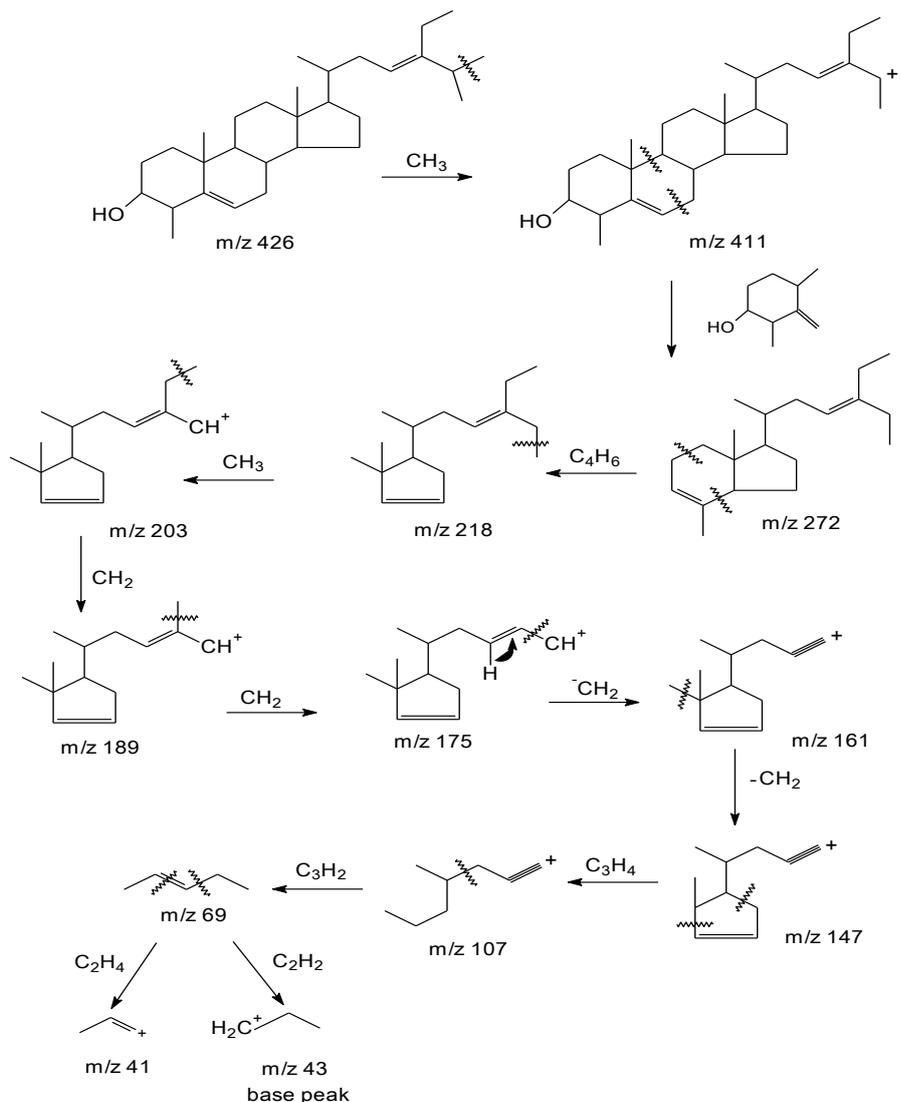


Gambar 5. Pola fragmentasi senyawa I.

Uji antiproliferatif pada penelitian ini dilakukan terhadap fraksi memiliki sitoksisitas tertinggi, yaitu fraksi 2b. Tingkat pertumbuhan sel Myeloma pada waktu inkubasi 0, 24, 48 dan 72 jam pada konsentrasi sampel 100, 50, dan 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ditunjukkan pada Gambar 2.

Berdasarkan grafik pada Gambar 2, diketahui bahwa pada perlakuan dengan kontrol (tanpa sampel) dengan waktu inkubasi 0, 24, 48 dan 72 jam jumlah sel semakin meningkat,

diindikasikan dengan semakin meningkatnya absorbans. Hal ini berarti masih terjadi pembelahan sel. Sedangkan pada perlakuan dengan sampel fraksi 2b, dengan variasi konsentrasi 100, 50 dan 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ terjadi penurunan jumlah sel, yang diindikasikan dengan semakin menurunnya nilai absorbans. Hal ini berarti sampel fraksi 2b mampu menghambat pertumbuhan sel kanker Myeloma.



Gambar 6. Pola fragmentasi senyawa II

Identifikasi senyawa fraksi 2b.

Spektrum IR (Gambar 3) menunjukkan adanya pita-pita serapan khas gugus fungsional senyawa, yaitu gugus -OH (3417,87 cm^{-1}), -CH₃ (3001,24), -CH₂ (2916,37 cm^{-1}), -C-O (1296,16 cm^{-1}) dan -C=C- (1658,78 cm^{-1} , dan 1026,13 cm^{-1}).

Berdasarkan spektrum IR maka fraksi 2b diperkirakan mengandung senyawa alifatik tidak jenuh yang tersubstitusi oleh gugus hidroksil (Hesse, *et al.*, 1997)

Hasil GC (*Gas Chromatography*) pada Gambar 4 menunjukkan adanya dua puncak

utama pada kromatogram, dengan waktu retensi 25,6 menit dan 26,4 menit.

Spektrum massa senyawa puncak I dengan waktu retensi 25,64 menit menunjukkan puncak ion molekul (M⁺) pada m/e 414. Puncak-puncak utama ion fragmen ditunjukkan dengan nilai m/e 396, 381, 303, 273, 231, 213, 199, 173, 145, 119, 81,57, dan 43 (puncak dasar) . Berdasarkan data GCMS, spektrum senyawa puncak I merupakan senyawa steroid golongan kolestan yaitu 4 metil-kolest-24-en-3-ol. Pola fragmentasi senyawa I disajikan pada Gambar 5.

Spektrum massa senyawa puncak II dengan waktu retensi 26,44 menit menunjukkan puncak ion molekul (M^+) pada m/e 426. Puncak-puncak utama ion fragmen ditunjukkan dengan nilai m/e 411, 272, 257, 218, 203, 189, 161, 135, 107, 81, 69, 41 dan 43 (puncak dasar). Berdasarkan data GCMS, spektrum senyawa puncak II juga merupakan senyawa steroid golongan stigmastan, yaitu 4-metil-stigmast-22-en-3-ol. Pola fragmentasi senyawa II disajikan pada Gambar 6.

Kesimpulan

Hasil fraksinasi dan uji sitotoksitas terhadap sel Myeloma pada ekstrak kloroform kulit batang *R. mucronata* diperoleh fraksi 2b dari kulit batang *R. mucronata* memiliki sitotoksitas tertinggi dengan IC_{50} sebesar 5 $\mu\text{g/mL}$.

Hasil identifikasi secara spektrometer fraksi 2b mengandung dua senyawa dari golongan steroid yaitu 4 metil- kolest-24-en-3-ol dan 4-metil-stigmast-22-en-3-ol.

Daftar Pustaka

- Astuti, P., Alam, G., Hartati, M. S., Sari, D., and Wahyuono, S., 2005, Uji Sitotoksik Senyawa Alkaloid dari Spons *Petrosia sp*: Potensial Pengembangan sebagai Antikanker, *Majalah Farmasi Indonesia*, 16(1), 58-63.
- Dean, M., 1998, Cancer as a Complex Development Disorder, *Cancer Res*, 58, 4543-4545
- Diastuti, H., and Suwandri, 2009, Fraksinasi dan Identifikasi Senyawa Antikanker Ekstrak Kulit Batang *Rhizophora mucronata* serta Uji Toksisitasnya terhadap Larva Udang (*Artemia salina* Leach), *Molekul*, 4(2), 1-10.
- Diastuti, H., Warsinah, and Purwati, 2008, Isolasi Senyawa Bioaktif sebagai Bahan Antikanker pada Tanaman *Rhizophora mucronata*, *Laporan Penelitian Hibah Bersaing I*, Unsoed, Purwokerto.
- Finney, D.I. Ed., 1952, Probit Analysis, Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Hesse, M., Meier, H., and Zeeh, B., 1997, *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*, George Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- Meiyanto, E., Sisindari, Kusnandar L.C., and Moordiani, 2003, Efek Anti Proliferatif Ekstrak Etanol Daun dan Kulit Batang Tanaman Cangkring (*Erythrina fusca* Lour) terhadap Sel HeLa, *Majalah Farmasi Indonesia*, 14, 124-131.
- Mosmann, T., 1983, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunological Methods*, 65, 55-63.
- Mursyidi, A., 1985, *Statistika Farmasi dan Biologi*, Ghalia Indonesia, Jakarta
- Soetarno, S., 2000, Potensi dan Manfaat Tumbuhan Mangrove sebagai Sumber Bahan Bioaktif, *Acta Pharmaceutica Indonesia*, 12(4), 84-103.
- Sarker, S.D., Latif, Z., and Gray, A.I., 2005, Natural Product Isolation, *Methods in Biotechnology*, 20, 1-25.
- Tantry, M.A., 2009, Plant Natural Product and Drugs : A Comprehensive Study, *Asian Journal Traditional Medicines*, 4(6), 241-249.
- Wyllie, A., Donahue, V., Fisher, B., Hill, D., Keeseey, J. and Manzow, S., 2000, *Cell Death Apoptosis and Necrosis*, Rosche Diagnosis Cooperation, New York.

*) Korespondensi : Hartiwi Diastuti
Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknik,
Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto
Email: hartiwidiaastuti@yahoo.com