

## Karakterisasi Senyawa Utama Ekstrak Daun *Aglaia elliptica* Blume dan Uji Sitotoksitas pada Sel Kanker Payudara

AGUNG ERU WIBOWO<sup>1\*</sup>, FRANS SUYATNA<sup>2</sup>, WAHONO SUMARYONO<sup>1</sup>,  
NURYATI CHAERANI SIREGAR<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pusat Teknologi Farmasi dan Medika, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Jakarta.

<sup>2</sup>Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Salemba, Jakarta.

Diterima 23 Juni 2009, Disetujui 27 Agustus 2009

**Abstract:** *Aglaia elliptica* Blume is one of plant species from the genus of *Aglaia*, belonging to the family of Meliaceae. This group of plants is known to have powerful cytotoxic effect. This research was conducted to isolate and characterize major compound(s) from ethanol extract of *Aglaia elliptica* leaf that can be used as marker compound(s) for extract standardization. Approximately 1000 g of *Aglaia elliptica* Blume leaf dry powder was extracted with ethanol using maceration method. Ethanol extract was then fractionated using *n*-hexane and ethyl acetate. Six sub-fractions were obtained from the Vacuum Liquid Chromatography (VLC) process of ethyl acetate fraction. Based on the HPLC profile and separation process using column chromatography and preparative HPLC, a major compound (with the weight of 36.80 mg) was successfully isolated from sub-fraction II. Analyses on its UV absorbance pattern, mass spectra, and proton NMR identified the isolated compound as a compound with molecular weight of 300, C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, known as odorin. Cytotoxicity test showed that odorin has inhibition effect against MCF-7 cell line with IC<sub>50</sub> of 153.32 ppm.

**Keywords:** isolation, major compound, *Aglaia elliptica* Blume, odorin, cytotoxicity test.

### PENDAHULUAN

*AGLAIA elliptica* Blume merupakan salah satu spesies dari genus *Aglaia sp.* famili Meliaceae. Sejak ditemukannya senyawa rokaglamid, derivat siklopenta[b] benzofuran dari *Aglaia elliptica* Blume yang menunjukkan aktivitas antileukemia pada model uji *in vivo* murin, berbagai penelitian lanjutan terus dilakukan<sup>(1)</sup>. Sebanyak 40 jenis derivat rokaglamid telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi<sup>(2)</sup> dan sebagian besar di antaranya menunjukkan potensi sitotoksik yang sangat kuat.

Sejak tahun 2000, berbagai penelitian untuk mengetahui efek sitotoksik senyawa rokaglamid ini mulai dilakukan. Bohnenstengel (2002) telah melakukan uji sitotoksik senyawa siklopenta[b] benzofuran dan beberapa derivatnya, termasuk rokaglamid, terhadap berbagai jenis sel kanker (*cell line*) seperti EM-3 (leukemia), MEL-JUSO (melanoma), RAJI (*lymphoma*) dan MONO-MAC-1

(leukemia). Hasil penelitian itu menunjukkan bahwa senyawa-senyawa tersebut sangat efektif menghambat pertumbuhan sel kanker<sup>(3)</sup>. Dari laporan hasil-hasil penelitian yang telah dilakukan, senyawa siklopenta[b] benzofuran dan derivatnya merupakan kelompok senyawa minor<sup>(2,4)</sup>.

Dalam rangka pengembangan tanaman *Aglaia elliptica* Blume menjadi sediaan obat herbal, perlu dilakukan isolasi senyawa yang dapat digunakan sebagai penanda (*marker*) dalam proses standarisasi ekstrak. Berdasarkan hal tersebut telah dilakukan isolasi senyawa utama dari ekstrak etanol daun *Aglaia elliptica* Blume yang dapat digunakan sebagai senyawa penanda.

### BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Daun *Aglaia elliptica* Blume yang diperoleh dari Kebun Raya Bogor, etanol, *n*-heksana, etil asetat, silika gel 60, 14-40 µm (Merck), Sephadex LH-20 (Aneershiem Bioscience), Lempeng silika gel GF<sub>254</sub> 20 x 20 cm (Merck), metanol-KCKT (Merck), medium RPMI 1640 (Gibco), MTT (Sigma), galur sel kanker payudara MCF-7 (*Human Breast Carcinoma*)

\* Penulis korespondensi, Hp. 08121863981  
e-mail: bowoae@yahoo.com



yang diperoleh dari CCRC-UGM. Peralatan ekstraksi, KCKT analitik (KNAUER detektor PDA), KCKT semi preparatif (WATER 600, detektor UV), GC-EIMS AGILENT TECHNOLOGIES 5973, Spektroskopi resonansi magnet inti  $^1\text{H}$ -RMI (HMR) JEOL JHM ECA-500.

**METODE. Ekstraksi dan fraksinasi.** Sebanyak 1 kg serbuk kering daun *A. elliptica* dimaserasi menggunakan pelarut etanol selama 2 jam dengan pengadukan dan proses diulang 3 kali. Setelah dilakukan penyaringan, filtrat dipekatkan dengan rotavapor vakum sampai diperoleh ekstrak etanol kental. Sebanyak 68 g ekstrak etanol kental difraksinasi dengan *n*-heksana dan dilanjutkan dengan etil asetat. Masing-masing fraksi dievaporasi sehingga diperoleh fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan fraksi air.

**Isolasi dan identifikasi senyawa utama.** Isolasi senyawa utama dilakukan dengan kromatografi kolom (dipandu dengan kromatografi lapis tipis dan KCKT analitik) dan KCKT semi preparatif. Selanjutnya dilakukan analisis berat molekul menggunakan GC-EIMS, analisis proton menggunakan spektroskopi resonansi magnet inti  $^1\text{H}$ -RMI dan analisis spektra UV.

**Uji sitotoksitas<sup>(6)</sup>.** Sebanyak 100  $\mu\text{l}$  suspensi sel MCF-7 dalam medium RPMI dimasukkan ke dalam sumur *micro plate*. Kultur diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator  $\text{CO}_2$  5%, suhu  $37^\circ\text{C}$ . Setelah 24 jam, ke dalam masing-masing sumur ditambahkan 100  $\mu\text{l}$  sampel uji dengan berbagai konsentrasi (setiap konsentrasi uji dilakukan 3 kali pengulangan). Untuk kontrol negatif ditambah 100  $\mu\text{l}$  medium kultur. Selanjutnya *micro plate* diinkubasi selama 3 hari dalam inkubator  $\text{CO}_2$  5%, suhu  $37^\circ\text{C}$ . Setelah inkubasi selesai, ke dalam setiap sumur ditambahkan 20  $\mu\text{l}$  MTT (50 mg MTT dalam 10 ml PBS steril) dan diinkubasi selama 4 jam, kemudian ditambahkan 100  $\mu\text{l}$  SDS. Selanjutnya dilakukan pembacaan absorbansi pada panjang gelombang 570 nm. Berdasarkan nilai absorbansi dilakukan perhitungan hambatan proliferasi dan ditentukan nilai  $\text{IC}_{50}$ .

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Ekstraksi, Isolasi dan Pemurnian.** Dari proses ekstraksi dan fraksinasi diperoleh ekstrak etanol kental dan 3 fraksi, yaitu fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi etanol-air (Tabel 1). Profil kromatogram hasil analisis dengan KCKT dari fraksi-fraksi tersebut disajikan pada Gambar 1.

Dari profil KCKT terlihat, sebagian besar senyawa utama berada dalam fraksi etil asetat. Selanjutnya terhadap fraksi etil asetat dilakukan pemisahan

**Tabel 1. Hasil fraksinasi ekstrak etanol daun *Agalia elliptica* Blume.**

Fraksi	Berat (g)
<i>n</i> -heksan	26,9342
Etil asetat	6,1534
Etanol-air	8,7543

menggunakan kromatografi cair vakum, *Vacuum Liquid Chromatography* (VLC), dengan fase diam silika gel 60 dan fase gerak (eluen) campuran metanol-diklorometan dengan sistem gradien (Tabel 2).

**Tabel 2. Komposisi eluen pada VLC (*Vacuum Liquid Chromatography*).**

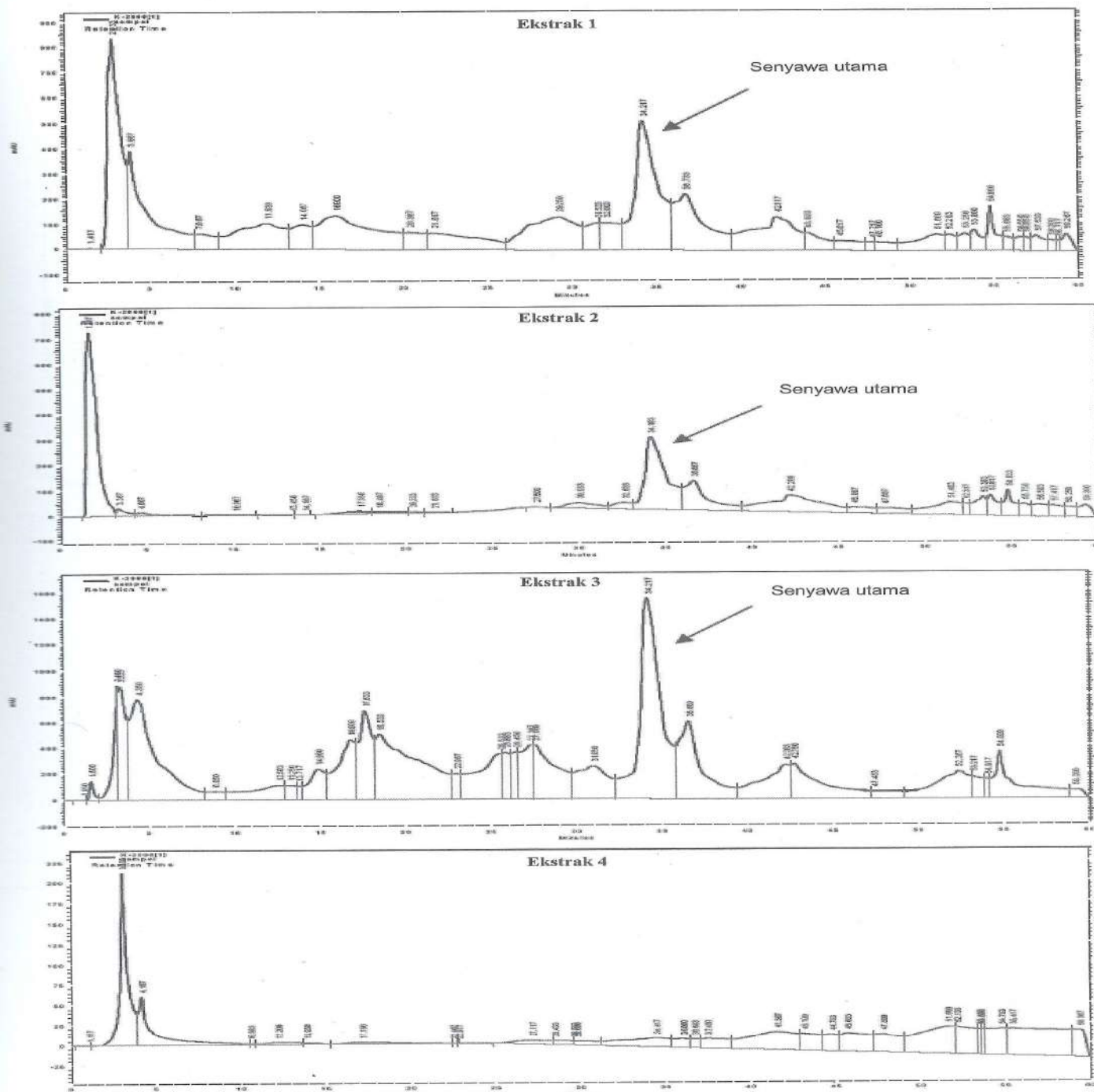
Eluen	MeOH (mL)	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (mL)	Jumlah (mL)
1	0	300	300
2	60	240	300
3	120	180	300
4	180	120	300
5	240	60	300
6	300	0	300

Dari proses VLC diperoleh 6 sub-fraksi (I, II, III, IV, V, dan VI). Terhadap enam sub fraksi tersebut dilakukan analisis KCKT, dan diketahui bahwa keberadaan senyawa utama di sub fraksi I dan II. Dari analisis kromatografi kolom subfraksi II dengan fase diam sephadex LH-20 dan fase gerak metanol yang dilanjutkan dengan KCKT semi preparatif dapat diisolasi 36,8 mg senyawa utama (Gambar 2).

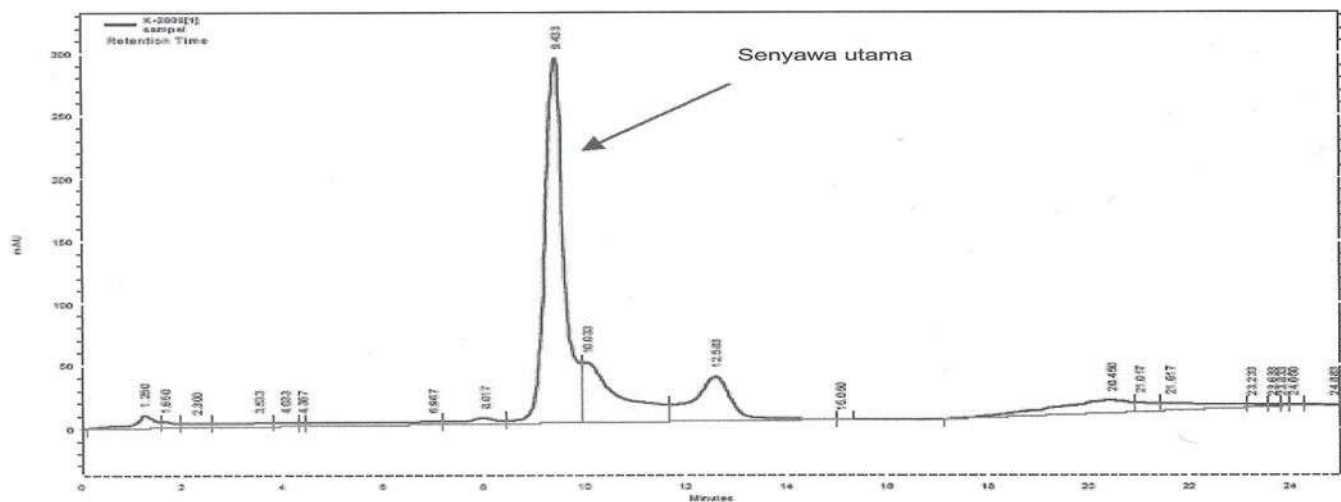
**Identifikasi senyawa isolat.** Senyawa utama hasil isolasi mempunyai panjang gelombang maksimum pada 282 nm. Terhadap isolat senyawa utama tersebut selanjutnya dilakukan analisis spektroskopi massa dan proton resonansi magnetik inti ( $^1\text{H}$ -RMI) (Gambar 3).

Data spektra masa EI senyawa utama menunjukkan pola fragmentasi dengan nilai  $m/z$  57, 85, 103, 131, 169 dan 215 dengan kelimpahan cukup tinggi. Selain itu terlihat pula nilai  $m/z$  300 walau kelimpahannya rendah. Pola fragmentasi ini menggambarkan adanya cincin aromatis, gugus olifenik dan keton pada struktur suatu senyawa yang telah diketahui, yaitu odorin<sup>(2)</sup>.

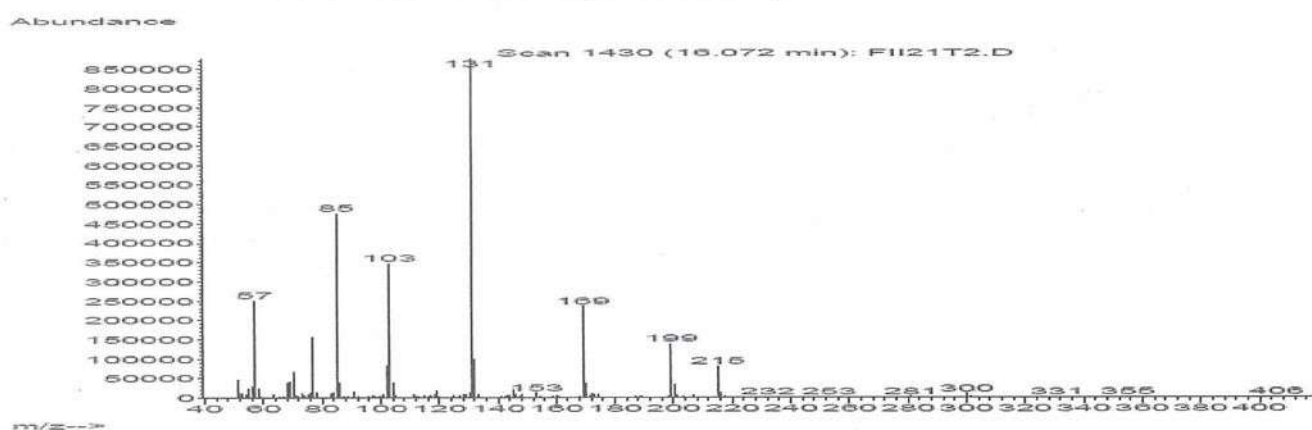
Data spektra  $^1\text{H}$ -RMI (Tabel 3) menunjukkan adanya tiga puncak multiplet pada geseran kimia 7,59 ppm, 7,58 ppm dan 7,54 ppm (d,  $J=8,6$  Hz) dengan integrasi 5 proton yang mengindikasikan adanya gugus aromatis. Sepasang puncak duplet



Gambar 1. Profil kromatogram KCKT ekstrak etanol (ekstrak 1), fraksi *n*-heksan (ekstrak 2), fraksi etil asetat (ekstrak 3), dan fraksi etanol-air (ekstrak 4) daun *Agalia elliptica* Blume.



Gambar 2. Profil kromatogram KCKT senyawa utama hasil isolasi



Gambar 3. Spektra masa senyawa hasil isolasi.

Tabel 3. Data Spektroskopi  $^1\text{H}$ -RMI isolat senyawa utama.

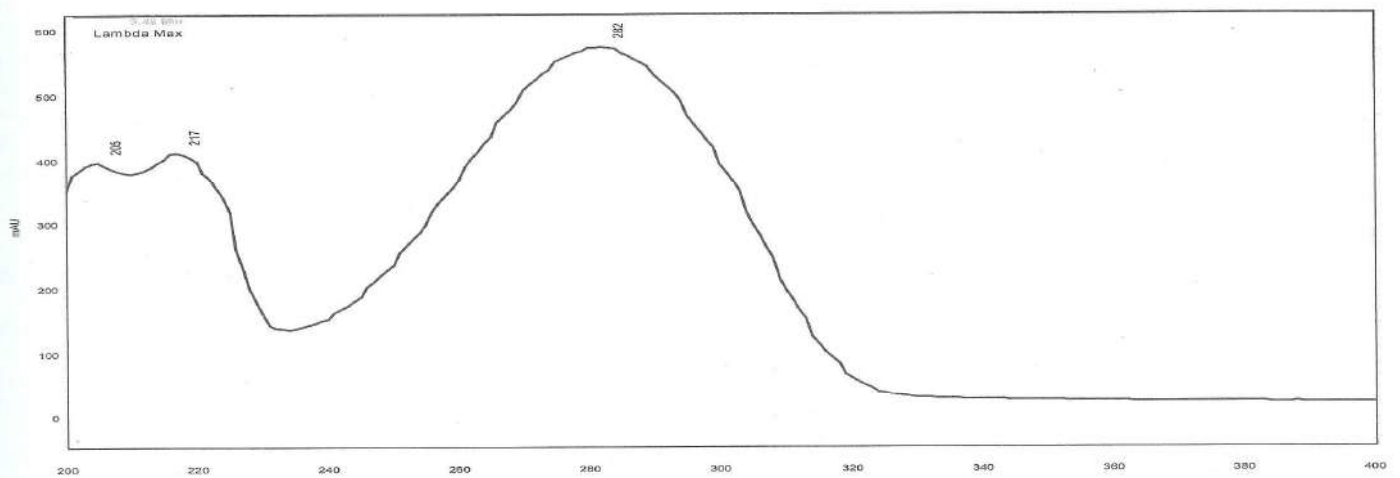
Posisi	$\delta$ H (ppm)	Posisi	$\delta$ H (ppm)
2	2,19 (m)	4'	A: 2,09 (m)
3	A : 1,75 (m)		B: 1,90 (m)
	B : 1,60 (m)	5'	A: 3,73 (m)
4	0,71 (t, $J=7,5$ )		B: 3,50 (m)
5	1,10 (d, $J=6,5$ )	2''	6,61 (d, $J=15,5$ Hz)
2'	6,14 (d, $J=5,5$ Hz)	3''	7,09 (d, $J=15,5$ Hz)
3'	A: 2,26 (m)	5''/9''	7,59 (m)
	B: 2,02 (m)	6''/8''	7,58 (m)
		7''	7,39 (m)



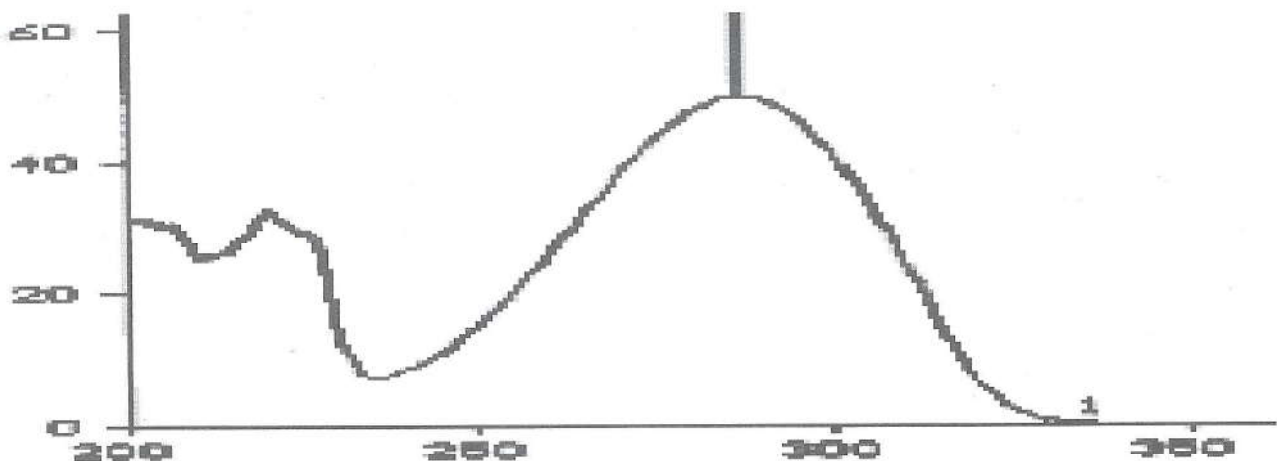
dengan geseran kimia 7,09 ppm (d,  $J=15,5$  Hz) dan 6,61 ppm (d,  $J=15,5$  Hz) menunjukkan adanya proton olifenik. Pada geseran kimia 3,5 ppm dan 3,7 ppm muncul puncak duplet dan multiplet, demikian pula pada geseran kimia antara 1,6 dan 2,1 ppm muncul berurutan puncak dalam bentuk multiplet yang mengindikasikan adanya sejumlah proton berdekatan yang saling kopling dan terjadi pula suatu kopling jauh di antara beberapa proton. Sementara itu, pada geseran kimia 1,10 ppm muncul puncak duplet dengan integrasi sekitar 3 proton yang

menunjukkan adanya gugus metil yang berdekatan dengan 1 buah proton dan pada geseran kimia 0,71 ppm muncul puncak triplet dengan integrasi 3 proton yang mengindikasikan adanya gugus metil yang berdekatan dengan 2 buah proton ( $\text{CH}_2$ )<sup>(2,6,7,8)</sup>.

Berdasarkan penelusuran pustaka, diperoleh informasi bahwa senyawa hasil isolasi juga mempunyai kemiripan pola spektra UV dengan senyawa yang sudah dikenal, yaitu odorin. Berikut perbandingan spektra UV dari senyawa hasil isolasi dan senyawa referensi/pustaka (Gambar 4)<sup>2)</sup>.



(A)

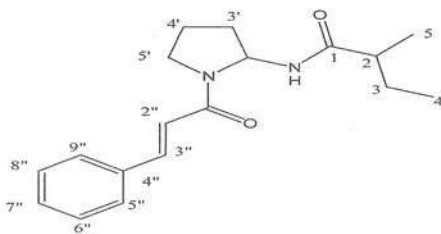


(B)

Gambar 4. Pola spektra UV senyawa hasil isolasi (A) dan senyawa referensi (B).

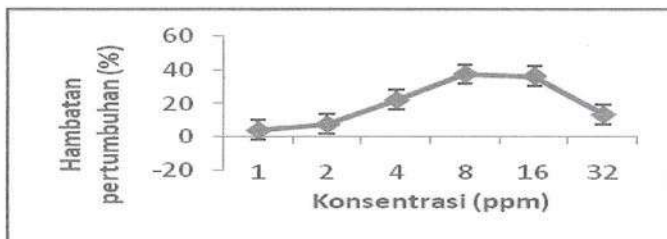
Selain itu, pola serta nilai pergeseran kimia dan kopling konstan antara senyawa hasil isolasi dan senyawa referensi (pustaka) juga menunjukkan adanya kemiripan.

Mengacu pada pola spektra UV, pola fragmentasi spektra massa dan  $^1\text{H}$ -RMI senyawa hasil isolasi dan dibandingkan dengan data pola UV, spektra massa dan  $^1\text{H}$ -RMI senyawa referensi (pustaka) yang telah dipublikasi sebelumnya<sup>(2)</sup>, maka isolat senyawa utama dari fraksi etil asetat adalah odorin,  $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$  dengan struktur kimia seperti yang disajikan pada Gambar 5.



Gambar 5. Senyawa odorin.

Selanjutnya, senyawa hasil isolasi dilakukan uji sitotoksitas pada galur sel kanker payudara MCF-7 dengan metode MTT. Pola hambatan pertumbuhan isolat senyawa terhadap galur sel kanker MCF-7 disajikan pada Gambar 6.



Gambar 6. Grafik hambatan pertumbuhan senyawa hasil isolasi terhadap sel MCF-7.

Dari analisis probit diperoleh bahwa nilai hambatan pertumbuhan ( $\text{IC}_{50}$ ) sebesar 153,32 ppm. Nilai tersebut jauh lebih besar dibandingkan dengan nilai  $\text{IC}_{50}$  senyawa rosiglamid terhadap beberapa jenis sel kanker ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ), sehingga dapat dikatakan bahwa senyawa utama hasil isolasi (odorin) bukan merupakan senyawa aktif dalam ekstrak etanol daun *Aglaia elliptica* Blume.

## SIMPULAN

Senyawa utama dalam ekstrak etanol daun *Aglaia elliptica* Blume adalah odorin. Hasil uji sitotoksitas menunjukkan, senyawa odorin bersifat kurang toksik terhadap galur sel kanker payudara MCF-7.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih disampaikan kepada Pusat Teknologi Farmasi dan Medika, Deputi Bidang Teknologi Agroindustri dan Bioteknologi – BPPT yang telah menyediakan tempat dan fasilitas serta dukungan bahan-bahan untuk penelitian; Program Rintisan Gelar Kementerian Negara Riset dan Teknologi yang telah memberi beasiswa dan bantuan dana penelitian program S3; dan kepada *Cancer Chemoprevention Research Centre (CCRC)* Fakultas Farmasi UGM yang memberikan sel MCF-7 untuk penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Kim S, Salim AA, Swanson SM, and Kinghorn A. Potential of cyclopenta[b]benzofurans from *Aglaia* species in cancer chemotherapy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2006.(6): 319-45.
- Chaidir. Insektizide rosiglamind-derivate und verwandte verbindungen aus *Aglaia*-arten (Meliaceae) [Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktores der bayerischen Julius-Maximilliana]. Wuerzburg: Universitat Wuerzburg; 2002.
- Bohnenstengel F. Inhaltsstoffe Austrophischen Meliaceen der gattung Aglaia und Melia, isoleurung, sturkturauffklarung und evaluierung der pharmakologisschen aktivitatentm [Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktores der bayerischen Julius-Maximilliana]. Wuerzburg: Universitat Wuerzburg; 2000.
- Nugroho BW, Güssregen B, Wray V, Witte L, Bringmann G, and Proksch P. Insectidal rosiglamide derivatives from *Aglaia elliptica* and *Aglaia harmsiana*. *Phytochemistry*. 1997.45(8)1579-85.
- MTT cell proliferation assay instruction catalog number 30-1010k, ATCC [serial online] 2001. Diambil dari <http://www.atcc.org>. Diakses tanggal 25 juni 2006.
- Inada A, Sorano T, Murata H, Inatomi Y, Darnaedi D, and Nakanishi T. Diamide derivatives and cycloartanes from the leaves of *Aglaia elliptica*. *Chem. Pharm. Bull.* 2001.49(9):1226-28.
- Abraham R.J, Fisher J, and Loftus P. Introduction to NMR spectroscopy. New York: John Wiley & Sons Ltd; 1991.
- Sanders JKM, Hunter BK. Modern NMR spectroscopy. A Guide for Chemist. Oxford: Oxford University Press; 1987.