

Isolasi, Identifikasi dan Uji Aktivitas Sitotoksik Skopolatin dari Daun *Macaranga hispida*(Blume) Mull. Arg

Isolation, Identification and Cytotoxic Activity of Scopoletin from Leaf of *Macaranga hispida*(Blume) Mull. Arg

MEGAWATI^{1,2*}, MUHAMMAD HANAFI², ENDANG SAEPUDIN¹, SOFA FAJRIAH²

¹Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Indonesia, Depok, Jawa Barat, Indonesia.

²Pusat Penelitian Kimia LIPI, Kawasan Puspiptek, Tangerang, Banten, Indonesia, 15314.

Submitted 3 Juli 2015, Accepted 12 Oktober 2015

Abstrak: Skopoletin diisolasi dari ekstrak metanol daun *Macaranga hispida*. Ekstrak daun diisolasi dengan menggunakan kromatografi dengan pelarut bergradien. Penentuan struktur kimia berdasarkan data spektroskopi dan dibandingkan dengan referensi. Uji sitotoksitas skopoletin menggunakan metode *assay* MTT terhadap sel MCF-7 dan T47D menunjukkan aktivitas sitotoksik yang kuat dengan IC_{50} 51,5 dan 66,5 $\mu\text{g/mL}$.

Kata kunci: skopoletin, *Macaranga hispida*, uji MTT, MCF-7, T47D.

Abstract: Scopoletin was isolated from the methanol extract of leaves of *Macaranga hispida*. leaf extract was isolated using chromatography with a solvent gradient. Determination of chemical structure-based on spectroscopic data and compared with the reference. Scopoletin cytotoxicity test using MTT assay method against MCF-7 and T47D cells showed strong cytotoxic activity with IC_{50} of 51.5 and 66.5 $\mu\text{g/mL}$.

Keywords: scopoletin, *Macaranga hispida*, MTT assay, MCF-7, T47D.

PENDAHULUAN

MACARANGA merupakan salah satu genus dari famili Euphorbiaceae, memiliki fungsi ekologi yang unik, serta telah menjadi bagian masyarakat dalam pengobatan tradisional. Kelompok tumbuhan ini lebih dari 308 spesies dengan pola penyebaran yang relatif luas, mulai dari Afrika dan Madagaskar di bagian barat hingga ke wilayah tropik Asia, Australia utara, dan kepulauan Pasifik di bagian timur ⁽¹⁾.

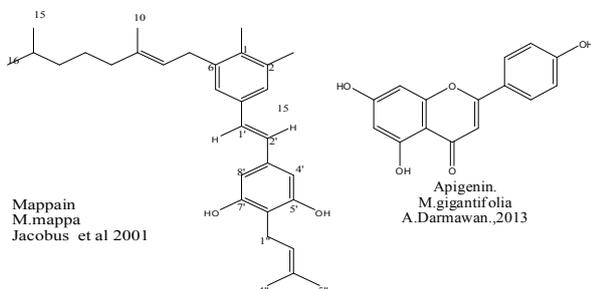
Indonesia merupakan salah satu pusat penyebaran tumbuhan yang dikenal masyarakat lokal sebagai “mahang-mahangan”. Hal ini terlihat dari dapat dijumpainya tumbuhan tersebut hampir di seluruh kawasan negeri ini. Umumnya, tumbuhan *Macaranga* berupa semak atau pohon, yang tumbuh di tempat yang

banyak mendapat sinar matahari, khususnya di hutan sekunder atau hutan yang sudah rusak. Oleh karena itu, tumbuhan ini dikenal sebagai tumbuhan pelopor. Dilihat dari segi kegunaan, tumbuhan *Macaranga* telah banyak dimanfaatkan untuk berbagai keperluan seperti bahan bangunan (tiang, atap, dll.) serta beberapa pengobatan tradisional. Beberapa penggunaan tumbuhan ini untuk obat tradisional, menurut Heyne⁽²⁾ antara lain digunakan sebagai obat diare, luka dan batuk. Metode yang dipakai dalam mengisolasi ekstrak metanol tumbuhan *M. hispida* dalam penelitian ini adalah kolom kromatografi.

Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa senyawa fenolik adalah senyawa utama tumbuhan *Macaranga*. Namun, belum ada publikasi yang membahas tentang *M. hispida*. Skopolatin adalah senyawa kimia yang umum ditemukan dalam berbagai tanaman ^(3,4).

* Penulis korespondensi, Hp 081380641055
e-mail: megarafandi@gmail.com

Dalam tulisan ini, akan dijelaskan struktur dan sifat senyawa fenolik, antioksidan dan sitotoksik senyawa yang diisolasi dari *M. hispida*. Di bawah ini ada beberapa senyawa murni yang diperoleh dari genus Macaranga.



Gambar 1. Struktur kimia beberapa senyawa yang terdapat dalam tumbuhan Macaranga.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun *M. hispida*, pelarut organik teknis (*n*-heksana, etil asetat, butanol dan metanol teknis), H_2SO_4 10 % dalam metanol, lempeng silika gel G60, silika gel G60 mesh 0,040-0,063 mm. Bahan yang digunakan untuk uji antioksidan digunakan yaitu sampel uji, *1,1-diphenyl-picryl-2-hidrazil* (DPPH), metanol dan kuersetin.

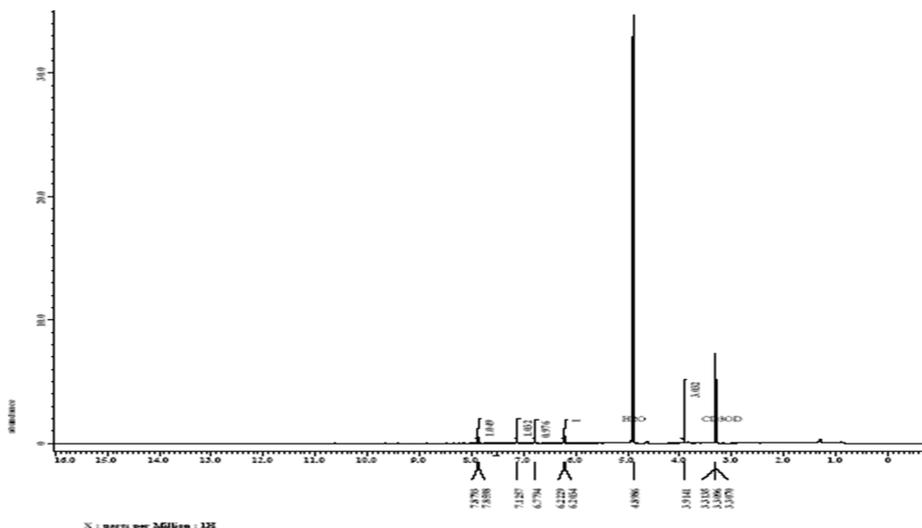
Sampel daun kering dari hutan Mekongga Kabupaten Kolaka (Sulawesi Tenggara). Identifikasi/determinasi tumbuhan dilakukan oleh Herbarium Bogoriense Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi LIPI, Bogor

Alat. Peralatan yang dipakai adalah alat-alat gelas kimia yang biasa digunakan di laboratorium, alat maserasi, corong pisah, botol 100 mL, botol kecil 5 mL (vial), neraca teknis Mettler Pc 2000, neraca analitik

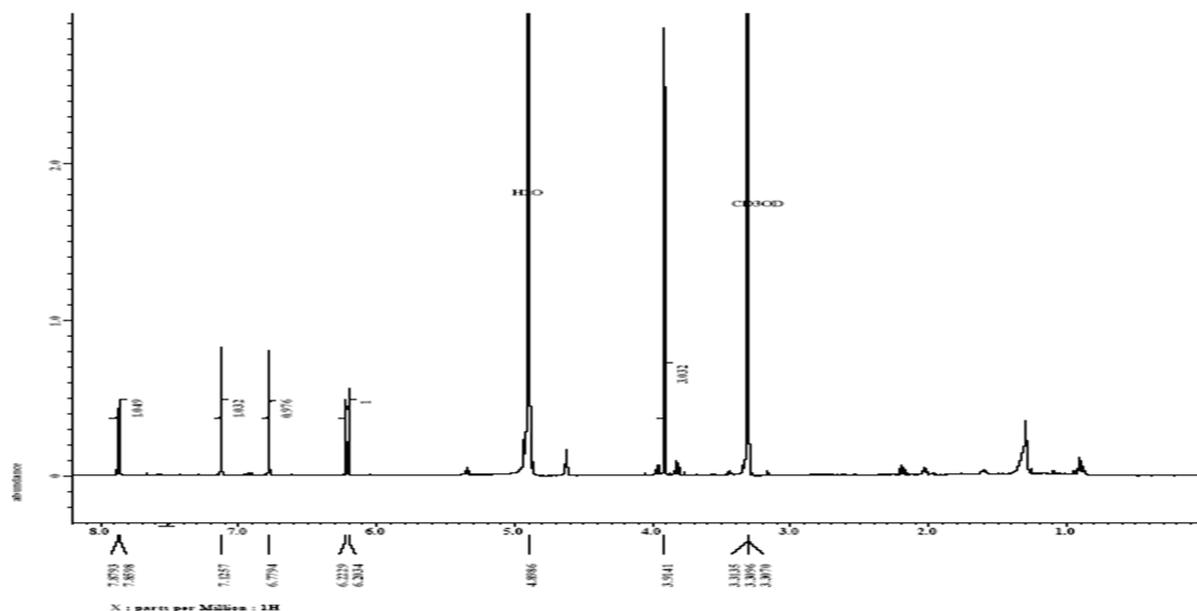
Mettler Tuledo AB 204, evaporator vakum Buhcii, kolom kromatografi, inkubator, lampu UV Shimadzu $\lambda_{254\text{ nm}}$ dan $\lambda_{366\text{ nm}}$, hot plate, eppendorf, tabung reaksi, spektrometer LC-MS mariner biospectrometry dan spektrometer FT-NMR JEOL JNM ECA 500.

METODE. Ekstraksi dan Isolasi⁽⁵⁾. Sebanyak 2,15 kg daun kering *M.hispida* diekstraksi dengan pelarut metanol dengan cara maserasi selama 3x24 jam sekali-sekali diaduk dengan menggunakan pelarut 3x20 L, kemudian disaring. Ekstrak metanol yang diperoleh selanjutnya dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40 °C sehingga diperoleh ekstrak kental metanol berwarna coklat kehitaman sebanyak 220 g. Sebanyak 150 g ekstrak metanol selanjutnya dipartisi (fraksinasi) menggunakan *n*-heksana, etil asetat, butanol dan air didapatkan ekstrak sebagai berikut fraksi heksan (31,793 g), fraksi etil asetat (14,365 g), fraksi butanol (29,078 g) dan fraksi air (30,504 g). Masing masing fraksi di lakukan uji antioksidan. Terhadap 20 g fraksi butanol dilakukan pemisahan lebih lanjut menggunakan teknik kromatografi kolom cepat menggunakan fase diam silika gel 60 G dan fase gerak dengan elusi bergradien, diperoleh 10 fraksi. Selanjutnya terhadap fraksi 3 (149,8 g) dilakukan pemisahan lebih lanjut dan di dapatkan isolat yang satu spot berwarna fluorosensi biru. Selanjutnya isolat diidentifikasi lebih lanjut menggunakan spektroskopi UV/Vis, FT-IR, LC-MS dan FT-NMR.

Isolat Murni. Senyawa murni berupa kristal warna putih kehijau-hijauan. Identifikasi menggunakan spektrofotometer NMR JEOL-ECA 500, δ_H (500 MHz dalam CD_3OD , $\mu g/mL$) 3,91 (*s*, 3H, H-6a (-OCH₃)), 7,12 (*s*, 1H, H-5), 6,78 (*s*, 1H, H-8), 6,20 (*d*, 1H, *J*=9.75 Hz, H-3), 7,87 (*d*, 1H, *J*=9,75 Hz, H-4) (Gambar 2). δ_C (125 MHz dalam CD_3OD , $\mu g/mL$) 164,1 (C-2), 116,1 (C-3), 146,3 (C-4), 112,7 (C-4a),



Gambar 2. Spektrum¹H-NMR isolat murni.



Gambar 3. Spektrum¹³C-NMR isolat murni.

110,0 (C-5), 147,2 (C-6), 151,5 (C-7), 104,0 (C-8), 153,0 (C-8a), 56,9 (C-6a)(Gambar 3). ESI-MS (m/z) 193,0101 [M⁺H]⁺.

Uji Aktivitas Antioksidan⁽⁶⁾. Sebanyak 4 mg sampel dilarutkan dalam 4 mL metanol (1000 µg/mL), dibuat larutan uji dengan konsentrasi 200, 100, 50 dan 10 µg/mL, dengan cara memipet 500, 250, 125 dan 25 µL larutan induk ke dalam tabung reaksi, kemudian masing-masing ditambahkan 500 µL larutan DPPH 0,5 mM dan diencerkan dengan metanol sampai 2,5 mL. Sebagai standar digunakan kuersetin dengan konsentrasi yang lebih kecil yaitu 50, 25, 10, 5 µg/mL dengan cara memipet 125, 62,5, 25 dan 12,5 µL larutan induk ke dalam tabung reaksi dan dikerjakan seperti di atas. Serapan DPPH diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515 nm, setelah diinkubasi sampai dengan 30 menit, pada suhu 37 °C. Nilai serapan larutan DPPH terhadap sampel tersebut dinyatakan dengan persen inhibisi (% inhibisi) dengan persamaan sebagai berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(\text{Abs}_{\text{kontrol}} - \text{Abs}_{\text{sampel}})}{\text{Abs}_{\text{kontrol}}} \times 100\%$$

Keterangan:

Abs_{kontrol} = Absorbansi (serapan) kontrol setelah 30 menit

Abs_{sampel} = Absorbansi (serapan) sampel setelah 30 menit

Aktivitas Anti Kanker. Aktivitas anti kanker dilakukan dengan metode MTT [3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida]⁽⁷⁾. Dengan pertumbuhan pada fase logaritma, dilarutkan dalam tabung kultur dengan jumlah sel sekitar 3 x 10³ sel/mL dalam media RPMI 1640. Sel diinokulasikan dalam *microplate* 96 lubang dasar rata dan dikultivasi dalam inkubator CO₂ selama 24 jam untuk menumbuhkan

sel. Selanjutnya dilakukan penambahan sampel yang dilarutkan dalam pelarut DMSO. Sampel diencerkan dengan menambahkan larutan dapar fosfat (PBS) pH (7,30–7,65). Sampel dengan konsentrasi yang beragam ditambahkan ke dalam sel dalam *microplate* lalu dikocok dengan *microplate mixer* dan disimpan kembali dalam inkubator CO₂. Sebagai kontrol negatif digunakan larutan PBS dan kontrol positif digunakan larutan PBS dan DMSO.

Sel diinkubasi selama 48 jam, kemudian ditambahkan pereaksi MTT dan dikocok menggunakan *microplate mixer*. Inkubasi dilanjutkan selama 4 jam, kemudian ditambahkan *stop solution* (SDS) dan dikocok dengan baik tanpa meninggalkan busa yang mengganggu dalam pengamatan. Inkubasi dilanjutkan kembali selama 24 jam. Pengukuran rapatan optis/*optical density* (OD) dilakukan dengan menggunakan *microplate reader*, 24 jam setelah penambahan SDS. Nilai IC₅₀ ditentukan dari kurva grafik hubungan antara konsentrasi senyawa bahan uji (µg/mL) dan rapatan optis setelah perlakuan dengan bahan uji. IC₅₀ merupakan konsentrasi yang diperlukan untuk penghambatan pertumbuhan sel sebesar 50%⁽⁸⁾.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Daun kering *M. hispida* diekstraksi dengan metanol. Ekstrak metanol dipartisi dengan *n*-heksana,etil asetat dan butanol. Dari ekstrak butanol dilakukan pemurnian dengan kolom kromatografi silika dan dihasilkan isolat murni.

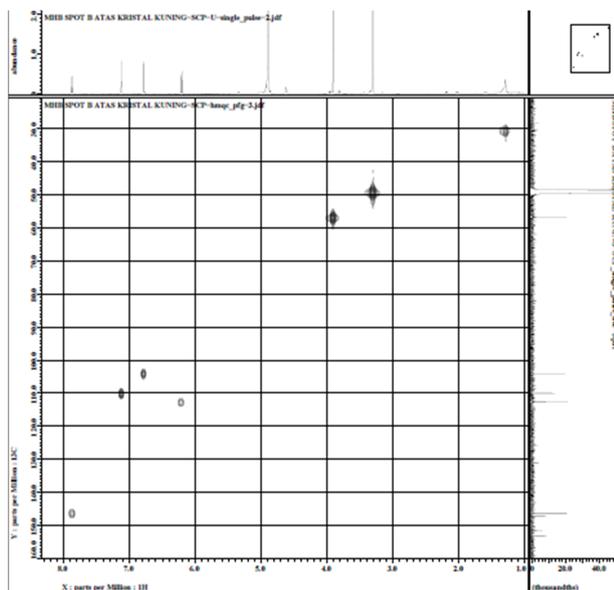
Pergeseran kimia H (δ_H, µg/mL) pada spektrum ¹H-NMR dalam CD₃OD, 500 MHz (Gambar 2) menunjukkan adanya 2 buah proton aromatik yang berbentuk *doublet* ditunjukkan oleh puncak-puncak

Tabel 1. Data NMR data dari isolat murni (¹H (500MHz) and ¹³C dalam CD₃OD) dan skopolatin.

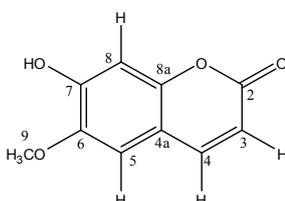
Posisi	Isolat murni δ_H (mult., J in Hz)	δ_c	Skopolatin ⁽⁸⁾ δ_H (mult., J in Hz)	δ_c
1	-	-	-	-
2	-	164,1	-	160,8
3	(6,20 (d, 9,75)	116,1	(6,25 (d, 9,75)	113,3
4	7,87 (d,9,75)	146,3	7,84 (d,9,75)	144,7
4a	-	112,7	-	112,1
5	7,12(s)	110,0	7,19(s)	109,9
6	-	147,2	-	146,0
7	-	151,5	-	151,9
8	6,78 (s)	104,0	6,79 (s)	103,7
8a	-	153,0	-	151,2
6a	3,91 (s)	56,9	3,90 (s)	56,7

pada daerah δ 6,20 dan 7,87 $\mu\text{g/mL}$ ($J = 9,75$ Hz) yang menunjukkan berada pada posisi *cis*, dan ada dua puncak proton yang berbentuk *singlet* pada pergeseran kimia δ 6,78 and 7,12 $\mu\text{g/mL}$, serta satu buah puncak tunggal dan tajam dengan intensitas tinggi dan nilai integrasi 3H yang menunjukkan adanya sebuah gugus metoksi ($-\text{OCH}_3$) pada δ_H 3,90 $\mu\text{g/mL}$.

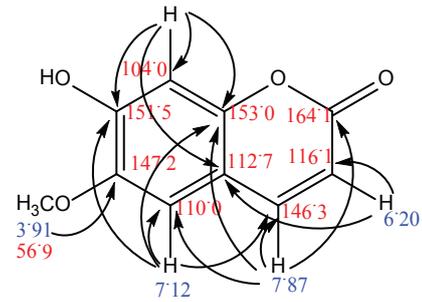
Berdasarkan data spektrum ¹³C-NMR (Gambar 3) dapat diketahui bahwa isolat murni mempunyai 10 karbon dimana 8 puncak karbon merupakan karbon aromatik yang berada pada pergeseran kimia δ 104,0; 110,0; 112,7; 116,1; 113,0; 146,2; 147,2 dan 153,0 $\mu\text{g/mL}$ dan 1-karbon metoksi pada δ 56,9 $\mu\text{g/mL}$, dan satu puncak gugus pada δ 164,1 $\mu\text{g/mL}$. Pergeseran



Gambar 4. Spektrum HMQC isolat murni.



Gambar 5. Struktur kimia isolat murni.



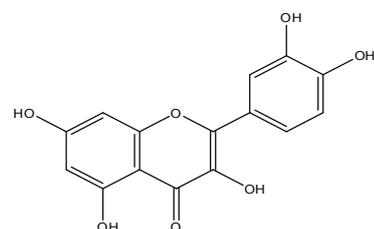
Gambar 6. Korelasi data HMQC and HMBC dari isolat murni.

kimia karbonil yang relatif lebih rendah pada gugus laktone dibandingkan dengan pergeseran gugus karbonil pada umumnya disebabkan oleh pengaruh posisi atom karbonil yang terikat langsung dengan atom elektronegatif (O) lainnya. Berdasarkan data yang spesifik, isolat murni ini merupakan golongan laktone yang mempunyai ikatan rangkap dan diduga isolat murni ini merupakan skopolatin.

Spektrum HMQC (Gambar 4) menunjukkan δ_H 6,20 $\mu\text{g/mL}$ (¹H, d) yang berkorelasi dengan δ_c 116,1 $\mu\text{g/mL}$ (H-3), δ_H 7,87 $\mu\text{g/mL}$ (¹H, d) dengan δ_c 146,3 $\mu\text{g/mL}$ (H-4), δ_H 7,12 $\mu\text{g/mL}$ (¹H, s) dengan δ_c 110,0 $\mu\text{g/mL}$ (H-5), δ_H 6,78 $\mu\text{g/mL}$ (¹H, s) korelasi dengan δ_c 104,0 $\mu\text{g/mL}$ (H-8) yang menandakan H dan C kepunyaan masing-masing. Proton metoksi pada δ_H 3,91 $\mu\text{g/mL}$ (³H, s) korelasi dengan δ_c 56,9 $\mu\text{g/mL}$ H-9.

Pada spektrum HMBC adanya korelasi antara proton dengan C yang berdekatan yang berjarak maksimal 3 ikatan dimana data korelasi dapat dilihat pada H-3 (δ 6,20 $\mu\text{g/mL}$ (¹H, d) berkorelasi dengan C-3 (δ 116,1 $\mu\text{g/mL}$), C-4a (δ 112,7 $\mu\text{g/mL}$); H-4 (δ 7,87 $\mu\text{g/mL}$ (¹H, d) dengan C-2 (δ 164,1 $\mu\text{g/mL}$), C-4 (δ 146,3 $\mu\text{g/mL}$), C-5 (δ 110,0 $\mu\text{g/mL}$), C-8a (δ 153,0 $\mu\text{g/mL}$); H-5 (δ 7,12 $\mu\text{g/mL}$ (¹H, s) dengan C-4 (δ 146,3 $\mu\text{g/mL}$), C-5 (δ 110,0 $\mu\text{g/mL}$), C-7 (δ 151,50 $\mu\text{g/mL}$), C-8a (δ 153,0 $\mu\text{g/mL}$); H-8 (δ 6,78) (¹H, s) korelasi dengan C-4a (δ 112,7 $\mu\text{g/mL}$), C-7 (δ 151,5 $\mu\text{g/mL}$), C-8 (δ 104,0 $\mu\text{g/mL}$) and C-8a (δ 153,0 $\mu\text{g/mL}$). Sementara itu, proton metoksi δ_H 3,91 $\mu\text{g/mL}$ (³H, s), δ_c 56,9 $\mu\text{g/mL}$) memperlihatkan korelasi dengan C-6 (δ 147,2 $\mu\text{g/mL}$). Korelasi antara HMQC dan HMBC isolat murni disajikan pada Gambar 6.

Spektrum LC-ESI-MS menunjukkan bahwa isolat murni mempunyai bobot molekul (m/z) 193 [M^+H]⁺, yang berarti bahwa bobot molekul isolat murni adalah



Gambar 7. Senyawa skopolatin.

Tabel 2. Hasil uji aktivitas antioksidan dari ekstrak daun *M. hispida* dan isolat murni.

No.	<i>M. hispida</i>	IC ₅₀ (µg/mL)
1.	Kuarsetin (standar)	4,39
2.	Ekstrak metanol	20,94
3.	Fraksi heksan	19,77
4.	Fraksi etil asetat	26,92
5.	Fraksi butanol	37,15
6.	Fraksi air	49,65
7.	Isolat murni	78,24

(m/z) 192 dan berdasarkan data NMR dan MS dari skopoletin⁽⁹⁾ (Tabel 1).

Ekstrak yang didapat diuji aktivitas antioksidannya dengan metode *radical scavenger* dan hasilnya dapat dilihat pada Tabel 2. Ekstrak dan fraksi memperlihatkan hasil yang mendekati dengan standar, sedangkan untuk isolat murni hasil IC₅₀nya jauh dari standar pembandingan yaitu kuarsetin. Hal ini disebabkan karena pada skopoletin hanya mengandung 1 gugus hidroksi (-OH), sedangkan yang lain termetilasi (-OCH₃). Disamping itu pada standar quersetin ada beberapa gugus hidroksi dalam keadaan bebas dan posisi orto, sehingga mampu meredam dengan baik radikal, sehingga lebih aktif dibandingkan skopoletin. Hasil publikasi lainnya menyatakan bahwa nilai IC₅₀ skopoletin 0,560Mm⁽¹⁰⁾.

Pada penelitian ini, senyawa hasil isolasi skopoletin mempunyai aktivitas terhadap sel kanker payudara MCF7 dan T47D untuk Isolat murni berturut-turut mempunyai nilai IC₅₀ 51,5 µg/mL dan 66,5 µg/mL. Hasil publikasi lainnya bahwa skopoletin yang berasal dari sintesis tidak mempunyai aktivitas sebagai antikanker terhadap sel MCF7 dengan nilai diatas 100 µg/mL⁽¹¹⁾.

SIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa salah satu senyawa fenolik yang terkandung dalam daun tanaman *M. hispida* adalah skopoletin dan berpotensi sebagai antikanker.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami sampaikan kepada Pusat Penelitian Kimia LIPI Serpong yang telah mendanai penelitian ini dan yang telah memfasilitasi laboratorium untuk penelitian ini dan kepada Dr. Ahmad Darmawan untuk

analisis spektrum NMR serta Dra. Puspa Dewi N.L, M.Eng untuk analisis spektrofotometer LC-MS dan atas diskusinya.

DAFTAR PUSTAKA

- Blattner FR, Weising K, Banfer G, Maschwitz U, Fiala B. Molecular analysis of phylogenetic relationships among Myrmecophytic *Macaranga species* (Euphorbiaceae). *Mol Phyl E.* 2001. 19:331-44.
- Heyne K. Tumbuhan berguna Indonesia. Jilid I. Jakarta: Yayasan Sarana Wanajaya; 1987.
- Bayoumi TY, Eid MH, Metwali EM. Application of physiological and biochemical indices as a screening technique for drought tolerance in wheat genotypes. *Afr J Biotechnol.* 2008. 7: 2341-52.
- Simoes KJD, Pessoni RAB, Cardoso-Lopes EM, Vivanco JM, Stermitz FR, Braga MR. Ipomopsin and hymenain, two biscoumarins from seeds of *Hymenaea courbaril*. *Phytochemistry Letter.* 2009. 2:59-62.
- Mizuo M, Hiroyuki K, Munekazu I, Toshiyuki T, Kiyoto G. Coumarin derivatives in *Coptis trifolza*. *Phytochemistry.* 1992. 31(2): 717-9.
- Megawati, Endang S, Muhammad H, Ahmad D, Puspa DNL. Identification and bioactivity studies of flavonoid compound from *Macaranga hispida* (Blume) Mull Arg. *Makara Journal of science.* 2015. 19(3).
- Yang J, Lin H, Mau J. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chem.* 2002. 77: 229-35.
- Harneti DR, Tjokronegoro A, Safari U, Supratman, Xe-Min L, Mukhtar MR, Mohamad K, Awang K and Hayashi H. Cytotoxic triterpenoid from the bark of *Aglaiia smithii* (Meliaceae). *Phytochemistry Letters.* 2012. 5: 496-9.
- Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJF, Abbot BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 1988. 48: 589-601.
- Darmawan A, Soleh K, Leonardus BSK, Yana MS. Scopoletin, a coumarin derivative compound isolated from *Macaranga gigantifolia* Merr. *Journal of Applied Pharmaceutical Science.* 2012. 2(12):175-7.
- Aline W, Leonardo NS, Alexandre SC, Luiz DAJ, Ana CL, Patrícia RO, Silvia HC, Luiz CDS. Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives. *Phytomedicine.* 2014. 21:240-6.
- Liu WAB, Jie HC, Jinpei ZA, Huibin ZA, Haiyang ZA, Yanhua CA, Ronald G. Synthesis and in vitro antitumor activity of novel scopoletin derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2012. 22: 5008-12.