

Sitotoksitas Fraksi Nonpolar *Brucea javanica* (L.) Merr. Terhadap Sel Kanker Payudara T47D

ARUM SETIAWAN¹⁾, ELVI RUSMIYANRO PANCANING WARDOYO²⁾, DAN ARY KUSMAWATI³⁾

¹⁾Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Sriwijaya, Indonesia. ²⁾Fakultas MIPA, Universitas Tanjungpura, Indonesia.

³⁾SMA Negeri 9 Pontianak, Indonesia

Intisari: Buah *Brucea javanica* (L.) Merr (Buah Makasar) telah banyak dimanfaatkan oleh masyarakat pedalaman Kalimantan untuk mengatasi berbagai macam penyakit, seperti diare, panas badan dan tumor. Informasi tentang aktivitas fraksi polar buah *B. javanica* asal Kalimantan Barat masih sangat terbatas. Tujuan penelitian ini ialah mengetahui aktivitas sitotoksik fraksi non polar *B. javanica* asal Kalimantan Barat terhadap sel kanker payudara T47D. Buah *Brucea javanica* (L.) Merr. yang diambil dari Taman Nasional Betung Karihun, Kalimantan Barat digunakan dalam penelitian ini. Sel kanker payudara yang digunakan ialah cell line T47D. Ekstrak kloroform buah *B. javanica* difraksinasi dengan menggunakan metode Kromatografi Vakum Cair (KVC). Fraksi non polar yang diperoleh dilakukan uji sitotoksitas dengan metode MTT assay. Sebagai pembanding digunakan obat standar Doxorubicin. Hasil uji sitotoksitas menunjukkan bahwa fraksi non polar buah *B. javanica* memiliki aktivitas sitotoksik sebesar $63,32 \pm 2,35 \mu\text{g/mL}$, lebih rendah dibandingkan dengan doxorubicin sebesar $38,29 \mu\text{g/mL}$. Golongan senyawa yang terdapat pada fraksi non polar buah *B. javanica* adalah terpenoid.

Kata kunci: *Brucea javanica*, kanker payudara, T47D, sitotoksitas, terpenoid

Abstract: Fruit *Brucea javanica* (L.) Merr (fruit Makasar) has been widely used by Borneo people to various diseases, such as diarrhea, body heat and tumors. The activities of polar fraction *B. javanica* fruit from West Kalimantan is still very limited. The aim of this study is to determine the cytotoxic activity of the non-polar fraction *B. javanica* from West Kalimantan on breast cancer cells T47D. Fruit *Brucea javanica* (L.) Merr. taken from Karihun Betung National Park, West Kalimantan used in this study. Breast cancer cells used is cell line T47D. *B. javanica* fruit chloroform extract was fractionated using Vacuum Liquid Chromatography (KVC). Non-polar fraction obtained cytotoxicity test performed with MTT assay method. Used as the standard drug doxorubicin. The results showed that the fraction of non-polar of *B. javanica* cytotoxic activity of $63.32 \pm 2.35 \mu\text{g} / \text{mL}$, lower than with doxorubicin at $38.29 \text{ mg} / \text{mL}$. Group of compounds contained in the non-polar fraction *B. javanica* fruit is terpenoids.

Email: arum.setiawan@unsri.ac.id

1 PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyebab kematian kedua setelah penyakit kardiovaskuler. Kanker merupakan penyakit yang disebabkan kegagalan mekanisme pengaturan multiplikasi dan fungsi homeostatis pada manusia (Nafrialdi & Gan, 2007). Kedua jenis kanker ini merupakan penyebab kematian utama bagi kaum perempuan.

Pengobatan kanker dapat dilakukan secara medis dan non medis. Pengobatan kanker secara non medis dilakukan melalui pemanfaatan tumbuhan yang secara etnobotani dan etnofarmakologi sudah diketahui sebagai tumbuhan obat. Pengobatan herbal dianggap sebagai alternatif pengobatan kanker yang murah dan dapat mengurangi efek samping yang ditimbulkan.

Obat herbal antikanker memiliki tingkat kemanjuran tinggi, bersifat selektif dan dapat bekerja secara spesifik terhadap sel target, serta tidak merusak

sel normal. Penemuan obat herbal dapat dilakukan dengan mengeksplorasi senyawa aktif yang berasal dari tumbuhan. Sampai saat ini dari sekitar 250.000 spesies tumbuhan tinggi yang telah diteliti, hanya 5% yang telah diketahui aktivitas biologinya (Nugroho & Verpoorte, 2002) dan hanya sekitar 100 senyawa yang bersifat sitotoksik telah ditemukan.

Penggunaan sel lestari kanker dalam pencarian senyawa antikanker memiliki keuntungan seperti mudah penanganannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, bersifat *repeatable*, homogenitas yang tinggi dan mudah diganti dengan frozen stock jika terjadi kontaminasi, serta secara *in vitro* dapat diketahui mekanisme molekular senyawa antikanker yang sedang dipelajari (Burdal *et al.*, 2003; Felth, 2011). Salah satu sel kanker yang banyak digunakan adalah sel kanker payudara T47D (*human ductal breast epithelial tumor cell line*). Sel kanker T47D pertama kali diisolasi dari jaringan

tumor duktal payudara seorang wanita berusia 54 tahun (Anonim, 2007).

Salah satu tumbuhan yang secara empiris dimanfaatkan sebagai obat tradisional oleh masyarakat pedalaman etnis Dayak, Cina dan Melayu adalah tumbuhan *Brucea javanica* (L.) Merr. (buah makasar). Secara umum, organ tumbuhan *Brucea javanica* (L.) Merr. yang digunakan adalah buah yang sudah tua dan berwarna hitam serta dikonsumsi langsung atau direbus.

Berdasarkan jurnal yang meneliti tentang *Brucea javanica* (L.) Merr. diketahui bahwa senyawa kimia yang telah diisolasi dari tumbuhan *Brucea javanica* (L.) Merr. sebanyak 78 buah senyawa. Senyawa kimia tersebut sebagian besar merupakan golongan terpenoid (Wardoyo *et al.*, 2009). Golongan senyawa kimia terpenoid diketahui memiliki potensi sebagai antikanker.

Beberapa penelitian tentang *Brucea javanica* (L.) Merr. pernah dilakukan oleh Sakaki *et al.*, (1985); Sakaki *et al.* (1986); Sakaki *et al.*, (1984); Khoyaiklang *et al.*, (2005); Greenwood *et al.*, (2002); Lau (2005); Sonlimar *et al.*, (2002) dan Wardoyo *et al.*, (2009), tetapi hanya fokus pada identifikasi senyawa dan aktivitas biologiknya saja, sehingga tidak dapat diketahui potensi tumbuhan *Brucea javanica* (L.) Merr. secara menyeluruh. Penelitian untuk melihat potensi fraksi non polar *Brucea javanica* (L.) Merr. masih sangat sedikit.

2 METODE PENELITIAN

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah *Brucea javanica* L. (Merr.) (nama lokal : Buah Makasar) yang diambil dari Hutan Penyangga Taman Nasional Gunung Palung, Kabupaten Kayong Utara Provinsi Kalimantan Barat.

Subyek uji dalam penelitian ini adalah sel kanker payudara T47D dan sebagai pembanding digunakan sel normal (sel Vero) yang diperoleh dari Laboratorium Parasitologi Bagian Kedokteran Tropis Fakultas Kedokteran UGM Yogyakarta. Bahan yang digunakan untuk kultur sel dan uji sitotoksitas sel kanker adalah media kultur *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Sigma), antibiotik penisilinstreptomisin (Sigma), *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% v/v (Gibco), *Phosphate Buffer Saline* (PBS) 1 x (Sigma), Trypsin 0,25% (Sigma), reagen (3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-2,5-diphenyl tetra zolium bromide (MTT), reagen stopper SDS 10% (Sigma) dalam HCl

0,1 N (Merck), *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) (Merck) dan alkohol 70%.

Bahan yang digunakan untuk ekstraksi, fraksinasi dan kromatografi adalah kloroform (pa, Merck), etil asetat (pa, Merck), metanol (pa, Merck), n-Heksan (pa, Merck), dikloromethan (pa Merck), aseton (pa Merck), asam asetat glasial (pa Merck), akuades, lempeng silika gel GF₂₅₄ (Merck), serbuk silika gel 60 PF₂₅₄ (Merck), perekasi semprot serum (IV) sulfat.

Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat-alat gelas (Pyrex), kamera digital (Sony), timbangan analitik (Sartorius), seperangkat *soxhlet* (Pyrex), oven (Mettler), freezer (Electrolux), *magnetic stirrer* (Nouva II), pompa vakum (Gast-USA), mikroskop inverted (Olympus CH-2), mikroskop binokuler (olympus), *deep freezer* -80°C (Shel Lab), Mikropipet (Eppendorf), *blue tips*, *yellow tips*, *white tips*, kertas saring biasa, hemositometer (Neubauer assistant), *Thin Layer Chromatography* (TLC) chamber, kompor listrik (Maspion), pelat kaca 20 x 20 cm, desikator, lampu UV $\lambda = 254$ nm dan 366 nm, *autoclave* (Hirayama HICLAV HV-25), refrigerator suhu dingin (Sanyo-Ultra Low), inkubator CO₂ (Hiraeus), sentrifuge (Sarvall MT 12V), *tissue culture flask* (Nunclon), *tissue culture test plate 96 well* (Iwaki), *Laminar air flow cabinet* (Labconco Purifier Class II Biosafety Cabinet), *ELISA reader* (BioRad-Mikroplate Reader Benchmark), *hand counter*, lemari es (Sharp).

Cara Kerja Penelitian

Tumbuhan yang diperoleh diidentifikasi mengacu pada buku kunci determinasi tumbuhan Suryo *et al.* (1981) dan Steenis (1992). Keakuratan spesies tumbuhan dideterminasi di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Fakultas Biologi UGM dan Herbarium Bogoriense Bogor.

Fraksinasi Ekstrak Potensial

Prosedur fraksinasi mengikuti cara yang dilakukan oleh Coll & Bowden (1986) yang menggunakan metode kromatografi vakum ciar (KVC). Fraksinasi dengan menggunakan kolom vakum SiO₂ 2 x 4 cm dengan menggunakan pelarut seperti pada tabel 1. Sampel ekstrak potensial sebanyak 3 g ditambah dengan serbuk silika gel 60 GF₂₅₄ sebanyak 5 g, sedikit demi sedikit sambil diaduk dalam cawan porselen hingga diperoleh campuran yang homogen dan kering. Pembuatan kolom SiO₂ dilakukan dengan memasukkan silika gel sedikit demi sedikit

ke dalam *sintered glass* sambil divakum untuk memperoleh massa fase diam yang kompak dan padat. Sampel yang sudah dikeringkan dengan silika gel hingga menjadi serbuk *free flowing* dipindahkan sedikit demi sedikit ke dalam *sintered glass* di atas fase diam dengan permukaan atas diusahakan rata sambil divakum.

Fraksinasi dilakukan dengan menuang pelarut secara perlahan-lahan pada permukaan kertas saring yang diletakkan di atas fase diam dan sampel dalam *sintered glass* sambil divakum. Pelarut yang digunakan dimulai dari yang paling non polar dan selanjutnya dengan pelarut yang lebih polar secara bertahap. Pelarut yang digunakan dalam fraksinasi ekstrak potensial dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Pelarut yang digunakan dalam fraksinasi ekstrak potensial

Fraksi ke-	Pelarut	Volume (ml)
1	n-Heksan 100%	100
2	Kloroform 100%	100
3	Kloroform : etil asetat = 30 : 1 (v/v)	100
4	Kloroform : etil asetat = 20 : 1 (v/v)	100
5	Kloroform : etil asetat = 10 : 1 (v/v)	100
6	Kloroform : etil asetat = 3 : 1 (v/v)	100
7	Etil asetat 100%	100
8	Etil asetat : metanol = 20 : 1 (v/v)	100
9	Etil asetat : metanol = 10 : 1 (v/v)	100
10	Etil asetat : metanol = 5 : 1 (v/v)	100
11	Etil asetat : metanol = 3 : 1 (v/v)	100
12	Metanol 100%	100

Hasil fraksinasi kemudian ditampung dalam cawan porselen dan dikeringanginkan dengan bantuan kipas angin. Berat masing-masing fraksi kemudian ditimbang.

Kromatograf Lapis Tipis (KLT) Fraksi dari Ekstrak Potensial

Kandungan bioaktif masing-masing fraksi hasil fraksinasi ekstrak potensial di monitor dengan KLT. KLT menggunakan fase diam berupa silika gel GF₂₅₄ dengan menggunakan pelarut tertentu. Orientasi dan pengembangan fase gerak dimulai dengan menggunakan pelarut yang *non polar* yaitu n-heksan dan kloroform serta selanjutnya dengan pelarut yang polar yaitu air dan aseton secara bertahap.

Lempeng KLT diaktifkan terlebih dahulu dengan menggunakan *hair dryer* selama 10 menit. Semua hasil fraksi yang diperoleh dan satu fraksi metanol potensial yang belum difraksinasi (sebagai pembanding) ditotolkan pada bagian bawah lempeng dengan jarak antar totolan 1 cm, diameter 2-3 mm, dikeringanginkan dan ditotol kembali.

Berdasarkan hasil orientasi dan pengembangan fase gerak, pelarut yang digunakan untuk KLT hasil fraksinasi adalah kloroform : etil asetat = 10:1.

Profil kromatogram divisualisasi dengan menggunakan sinar tampak, sinar UV $\lambda = 254$ nm dan sinar UV $\lambda = 366$ nm, disemprot dengan dengan serium (IV) sulfat, dipanasi dalam oven 100 °C. Fraksi dengan pola kromatogram mirip digabungkan dan ditimbang beratnya. Senyawa bioaktif yang terdapat dalam fraksi gabungan dimonitor dengan menggunakan KLT.

Uji Sitotoksitas Fraksi (MTT Assay)

Perbanyak Cell Line T47D

Kultur *cell line* T47D mengacu protokol yang dilakukan oleh CCRC (2009). Kultur stok *cell line* T47D dalam *cryogenic tube* dikeluarkan dari refrigerator dan dibiarkan mencair pada suhu kamar. *Cryogenic tube* kemudian dibawa ke *laminar air flow cabinet*, *cell line* T47D dipipet dengan mikropipet steril dan dipindahkan ke dalam *conical tube* ukuran 15 ml steril, ditambahkan medium DMEM sebanyak 10 ml, dipasang dalam alat sentrifuge dan disentrifugasi dengan kecepatan 700 rpm selama 10 menit hingga sel mengendap. Setelah itu, supernatan dibuang, pelet ditambah dengan medium kultur sebanyak 5 ml, diresuspensi dengan pipet pasteur steril, dan sel terlarut dipindahkan ke dalam 2 buah *cultur flask* steril. Medium kultur dapat ditambahkan bila dasar *culture flask* belum tergenang oleh medium. Sel kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ pada suhu 37 °C, 5% CO₂ dan diamati setiap hari. Penggantian medium dilakukan apabila medium dalam *culture flask* sudah berubah warna dari merah muda menjadi jingga atau kuning. Jika sel sudah kofluen (menutupi 90% dasar *culture flask*) maka sel siap untuk dipanen.

Panen Sel

Kultur sel dikeluarkan dari inkubator CO₂, dibawa ke *laminar air flow cabinet*, dibuang media kulturnya dengan pipet pasteur steril dan dicuci dengan menggunakan PBS, ditambahkan 500 μ l tripsin 0,05% lalu diinkubasikan selama 3-5 menit dalam inkubator CO₂ (37 °C, 5% CO₂) hingga sel terlepas dari dasar flask, lalu ditambahkan 3 ml media kultur dan diresuspensi dengan pipet pasteur steril. Sel terlarut dipindahkan dalam *conical tube* steril ukuran 15 ml. Selanjutnya diambil 10 μ l dengan mikropipet untuk dihitung dengan hemositometer dibawah mikroskop *inverted*. Sel diamati dan dihitung. Volume yang diperlukan sebanyak 100 μ l x 100 well = 10 ml.

Uji MTT Assay

Penentuan kadar yang digunakan untuk uji sitotoksik mengacu protokol CCRC (Anonim, 2009). Seratus mikroliter suspensi yang berisi *cell line* T47D dalam media kultur yang mengandung $1,5 \times 10^4$ sel dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran *microplate* 96 *well*. Mikroplate diinkubasi dalam inkubator CO₂ selama 12 jam pada suhu 37°C, 5% CO₂. Setelah 12 jam, morfologi sel diamati dengan *inverted microscope* untuk dilihat apakah sel dalam kondisi baik dan tidak terjadi kontaminasi. Setelah sel melekat dengan baik pada dasar mikroplat, media sel di dalam setiap sumuran dibuang, kemudian ke dalam setiap sumuran tersebut ditambahkan 100 µl media baru yang sudah mengandung ekstrak dengan kadar tertentu. Mikroplate diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C, 5% CO₂. Setelah 24 jam, morfologi sel diamati, media dan ekstrak dibuang dari dalam mikroplat dan dicuci dengan PBS. Ke dalam setiap *well plate* ditambahkan 110 µl larutan MTT (konsentrasi MTT 0,5 mg/ml) dan *microplate* diinkubasikan pada suhu 37°C, 5% CO₂. Setelah 4 jam ditambahkan 100 µl reagen *stopper* SDS 10% dalam HCl 0,1N ke dalam setiap *well* (untuk melarutkan kristal *purple formazan*). Mikroplat diinkubasi kembali selama 12 jam pada suhu kamar. Absorbansi dibaca dengan menggunakan ELISA reader pada $\lambda = 595 \text{ nm}$ (Wilson *et al.*, 2004).

Menurut Anonim (2009), persentase kematian sel dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ kematian sel} = \frac{(a - b) - (c - b)}{(a - b)} \times 100\%$$

Keterangan: a = absorbansi kontrol sel
b = absorbansi kontrol media
c = absorbansi sampel

Analisis Data

Data hasil perhitungan nilai IC₅₀ fraksi aktif dianalisis dengan analisis variansi untuk mengetahui beda nyata perlakuan dan dilanjutkan dengan uji analisis *duncan multiple range test* (DMRT) untuk mengetahui beda nyata antar perlakuan.

3 HASIL DAN PEMBAHASAN

Fraksinasi dan Profil KLT Senyawa Bioaktif dari Ekstrak Aktif

Pencampuran ekstrak potensial dengan silika gel bertujuan untuk memperluas permukaan kontak

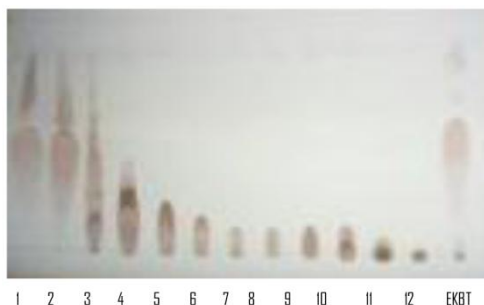
ekstrak dengan fase diam dan fase gerak yang digunakan, sehingga proses pemisahan dan penarikan senyawa dalam ekstrak dapat berlangsung maksimal.

Pengaliran pelarut dilakukan secara berurutan dan bergantian dimulai dari pelarut yang *non polar* (n-heksan) menuju ke pelarut yang paling polar (metanol). Senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak akan terpisah berdasarkan tingkat kepolarannya. Senyawa yang *non polar* akan keluar dari kolom terlebih dahulu, kemudian diikuti senyawa yang lebih polar (Sherma, 2003; Nyireddy, 2003).

Analisis KLT dilakukan untuk *monitoring* senyawa yang terkandung dalam setiap fraksi yang dihasilkan. Visualisasi bercak pada plat KLT menggunakan sinar tampak, sinar UV dengan $\lambda = 254 \text{ nm}$ dan $\lambda = 366 \text{ nm}$. Profil kromatogram akan nampak nyata setelah disemprot dengan serum (IV) sulfat. Berdasarkan *monitoring* KLT fraksi-fraksi yang dihasilkan, dapat ditunjukkan bahwa proses pemisahan yang dilakukan dengan metode KCV dapat memisahkan kelompok senyawa yang terkandung dalam ekstrak potensial menjadi beberapa kelompok senyawa yang lebih sederhana.

Profil kromatogram fraksi hasil fraksinasi pereaksi semprot serum (IV) sulfat dapat lihat pada Gambar 1. Berdasarkan profil kromatogram 12 fraksi dari ekstrak potensial, tampak ada kesamaan profil beberapa fraksi. Profil kromatogram fraksi 1 dan 2 mirip, fraksi 3,4 dan 5 mirip dan fraksi 6 sampai 12 mirip, sehingga dilakukan penggabungan fraksi-fraksi tersebut. Penggabungan fraksi dilakukan dengan tujuan untuk menyederhanakan fraksi yang diperoleh. Penggabungan fraksi menghasilkan 3 fraksi gabungan, yaitu fraksi gabungan 1 (F1), fraksi gabungan 2 (F2) dan fraksi gabungan 3 (F3). Penggabungan fraksi-fraksi yang memiliki kesamaan profil dan berat fraksi gabungan dapat dilihat pada Tabel 2.

Fraksi 1 dan 2 (fraksi gabungan F1) menggunakan pelarut n-heksan dan kloroform yang bersifat *non polar* memiliki berat ekstrak yang paling besar (2,20 g). Senyawa yang larut dalam pelarut *non polar* merupakan senyawa *non polar*. Pelarut n-heksan dan kloroform dapat mengelusi senyawa-senyawa yang bersifat *non polar*, seperti terpenoid, quasinoid termasuk asam lemak yang banyak terdapat dalam biji *Brucea javanica* (L.) Merr. Berat masing-masing fraksi dan fraksi gabungan yang dihasilkan dapat dilihat pada tabel 2.

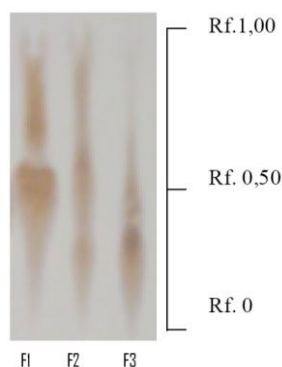


Gambar 1. KLT fraksi hasil fraksinasi (fase diam silika gel GF₂₅₄; fase gerak kloroform : etil asetat = 10 : 1, pereaksi semprot Serum (IV) sulfat)

Tabel 2. Berat masing-masing fraksi dan fraksi gabungan yang dihasilkan

No.	Fraksi	Kode fraksi gabungan	Berat fraksi gabungan (g)
1	Fraksi 1	F1	2,20
2	Fraksi 2		
3	Fraksi 3	F2	0,65
4	Fraksi 4		
5	Fraksi 5		
6	Fraksi 6	F3	0,13
7	Fraksi 7		
8	Fraksi 8		
9	Fraksi 9		
10	Fraksi 10		
11	Fraksi 11		
12	Fraksi 12		

Kromatogram KLT fraksi F1 menghasilkan bercak dengan nilai Rf sebesar 0,53; 0,76 dan 0,83 dan fraksi F2 menghasilkan bercak dengan nilai Rf sebesar 0,23; 0,33 dan 0,73, sedangkan fraksi F3 menghasilkan bercak dengan nilai Rf sebesar 0,37 dan 0,47. Berdasarkan nilai Rf fraksi gabungan menunjukkan bahwa penggabungan fraksi yang dilakukan tidak menghasilkan profil yang berbeda dengan profil kromatogram fraksi-fraksi hasil KVC. Kromatogram fraksi 1, F2 dan F3 dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. KLT fraksi F1, F2 dan F3 (fase diam = silika gel GF₂₅₄; fase gerak kloroform : etil asetat = 10 : 1, Pereaksi semprot Serum (IV) sulfat)

Aktivitas Sitotoksik Fraksi Gabungan dari Ekstrak Potensial

Penggabungan fraksi hasil fraksinasi EKB untuk menyederhanakan jumlah fraksi yang diuji sitotoksitasnya. Uji sitotoksitas dilakukan dengan menggunakan sel kanker payudara T47D. Kadar konsentrasi yang digunakan adalah 400, 200, 100, 50 dan 25 $\mu\text{g/mL}$. Hasil uji sitotoksik ketiga fraksi gabungan dapat dilihat pada Tabel 3.

Efek sitotoksik fraksi F1 dan F2 terhadap sel kanker payudara T47D terlihat lebih nyata dibanding dengan efek ekstrak *Brucea javanica* (L.) Merr. Analisis variansi yang dilanjutkan dengan analisis DMRT terhadap ke-3 fraksi gabungan menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antar fraksi gabungan.

Tabel 3. Nilai IC₅₀ fraksi gabungan dari ekstrak potensial *Brucea javanica* (L.) Merr. terhadap sel T47D ($\mu\text{g/mL}$)

No.	Bahan	Kode	Nilai IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
1.	Fraksi gabungan 1	F1	63,32 \pm 2,35 ^a
2.	Fraksi gabungan 2	F2	69,95 \pm 0,36 ^b
3.	Fraksi gabungan 3	F3	356,75 \pm 0,95 ^c

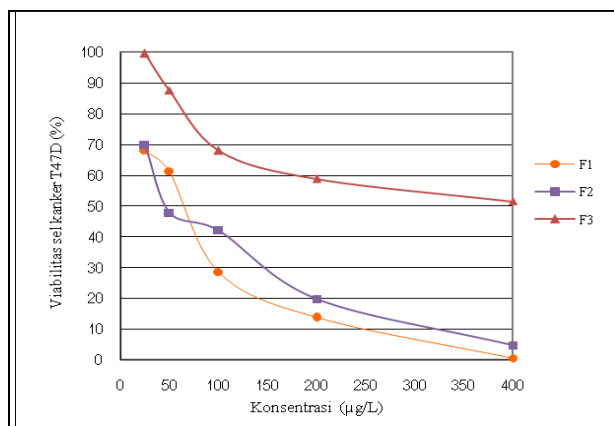
Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama pada setiap kolom tidak berbeda nyata (N=3, $p < 0,05$)

Berdasarkan Tabel 3, dapat memperlihatkan, fraksi F1 memiliki nilai IC₅₀ terkecil, yaitu sebesar 63,32 $\mu\text{g/mL}$ dibandingkan nilai IC₅₀ fraksi gabungan F2 (69,95 $\mu\text{g/mL}$) dan F3 (356,75 $\mu\text{g/mL}$). Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Moeljopawiro *et al.* (2007) yang menggunakan metode KVC untuk fraksinasi buah merah (*Pandanus* sp) dan ternyata dapat meningkatkan efek sitotoksiknya.

Fraksi F1 merupakan fraksi gabungan yang mengandung senyawa bersifat *non polar*. Dibandingkan dengan doxorubicin (nilai IC₅₀ sebesar 38,29 $\mu\text{g/mL}$), nilai IC₅₀ ketiga fraksi gabungan masih lebih tinggi. Meskipun fraksi gabungan memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih rendah jika dibandingkan dengan obat standar doxorubicin, tetapi senyawa metabolit yang terkandung dalam fraksi gabungan tersebut dapat dikembangkan sebagai agen anti-kanker (Wahyuningsih *et al.*, 2003). Hubungan antara konsentrasi fraksi gabungan dengan persentase viabilitas sel kanker payudara T47D terdapat pada Gambar 3.

Penelitian dilanjutkan dengan menggunakan fraksi F1 dengan 2 dasar, pertama, fraksi F1 merupakan fraksi yang paling toksik (IC₅₀ 63,32 $\mu\text{g/mL}$) (lihat Gambar 15) dan kedua, memiliki berat ekstrak yang paling besar (2,20 g). Penelitian dilanjutkan

dengan analisis KLTP. Selanjutnya fraksi gabungan F1 disebut sebagai fraksi gabungan aktif.



Gambar 3. Sitotoksistas fraksi F1, F2 dan F3 terhadap sel T47D. (F1=fraksi gabungan pertama; F2=fraksi gabungan kedua; F3=fraksi gabungan ketiga)

Pengujian efek sitotoksik senyawa yang terkandung dalam tumbuhan *Brucea javanica* (L.) Merr. dilakukan dengan menggunakan reagen MTT. Senyawa bahan alam diperlakukan pada kultur sel kanker T47D secara *in vitro*. Dasar pengujian ini adalah reaksi reduksi MTT yang terjadi karena aktivitas sel hidup membentuk kristal formazan. Pembentukan formazan terjadi karena berkaitan langsung dengan aktivitas metabolisme sel hidup dalam kultur yang secara langsung dapat diukur absorbansinya menggunakan ELISA reader pada $\lambda = 595$ nm (Wilson *et al.*, 2004; Gonzalves *et al.*, 2010). Ekstrak potensial yang dapat digunakan sebagai agen kemoterapi kanker apabila memiliki nilai IC_{50} kurang dari $1000 \mu\text{g/mL}$ (Doyle & Griffiths, 2000).

Studi yang dilakukan sebelumnya, telah diketahui bahwa tumbuhan *Brucea javanica* (L.) Merr. mengandung senyawa golongan alkaloid, quasinoid, terpenoid dan lipid. Pada penelitian ini, senyawa aktif dalam buah dan biji *Brucea javanica* (L.) Merr. larut dalam pelarut *non polar* dan *polar* (Wardoyo *et al.*, 2011).

Biji merupakan organ *sink* bagi tumbuhan yang berperan untuk regenerasinya. Senyawa yang berkaitan dengan proses regenerasi tumbuhan akan ditransport ke dalam biji. Biji juga mampu mensintesis senyawa (*source*) yang diperlukan untuk regenerasi. Oleh karena itu, buah dan biji mengandung senyawa metabolit sekunder yang lebih kompleks bila dibandingkan dengan organ yang lain. Metabolit sekunder akan disimpan pada buah dan biji sebagai cadangan makanan, sumber energi dan pertahanan diri (*sel-defense*). Jenis dan konsentrasi senyawa metabolit sekunder yang lebih kompleks menyebabkan buah dan biji berpotensi

memiliki aktivitas biologi yang lebih luas (Robinson, 1991; Campbell *et al.*, 2008). Menurut Campbell *et al.* (2008), berkaitan dengan fungsinya, buah dan biji merupakan salah satu organ yang dijadikan sebagai lokasi akumulasi senyawa metabolit sekunder. Biji yang sudah tua diprediksi mengandung senyawa metabolit sekunder yang lebih kompleks.

Ekstraksi secara sokletasi menggunakan pelarut kloroform akan melarutkan senyawa metabolit sekunder yang bersifat *non polar*. Senyawa *non polar* yang telah diketahui bersifat sitotoksik, antara lain berasal dari golongan terpenoid, quasinoid dan sebagian asam lemak (Alexandrova *et al.*, 2000). Kemampuan ekstrak EKBT menghambat proliferasi sel kanker disebabkan karena buah dan biji memiliki senyawa bioaktif anti kanker yang bersifat *non polar*.

Metode KVC dapat digunakan untuk memisahkan senyawa kompleks terpenoid menjadi fraksi yang lebih sederhana (Coll & Bowden, 1986); Pelletier *et al.*, 1986). Fraksinasi secara KVC mampu memisahkan ekstrak EKBT menjadi 12 fraksi yang memiliki komposisi kandungan senyawa yang lebih sederhana. Fraksi yang memiliki profil kromatogram yang sama digabungkan untuk menyederhanakan fraksi, dan didapatkan 3 fraksi gabungan. Fraksi gabungan pertama (F1) merupakan gabungan fraksi n-heksan dan kloroform. Fraksi gabungan F1 ini mengandung senyawa yang bersifat *non polar*. Fraksi gabungan F1 memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker T47D (nilai IC_{50} $63,32 \mu\text{g/mL}$) yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak EKBT (nilai IC_{50} $95,59 \mu\text{g/mL}$).

Uji sitotoksistas fraksi gabungan F1 menunjukkan adanya penurunan nilai IC_{50} dan peningkatan aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker T47D. Peningkatan efek sitotoksistas ini diprediksi oleh meningkatnya efek sinergisme senyawa yang terkandung dalam fraksi gabungsn F1. Aktivitas sitotoksik yang ditimbulkan oleh suatu komponen senyawa kimia juga dapat berasal dari efek kombinasi antara senyawa yang tidak atau kurang aktif dan senyawa yang aktif. Sifat aktif suatu senyawa akan saling meningkatkan dan menghasilkan aktivitas yang lebih tinggi (Moeljopawiro *et al.*, 2007).

4 KESIMPULAN

Berdasarkan hasil pembahasan dan analisis data dapat disimpulkan bahwa fraksi gabungan n-heksan dan kloroform 100% memiliki aktivitas sitotoksik paling tinggi terhadap sel kanker payudara T47D dengan nilai IC_{50} sebesar $63,32 \mu\text{g/ml}$.

REFERENSI

- Alexandrova, R., I. Alexandrov, M. Velcheva, T. and Varadinova 2000. Phytoproducts and Cancer. *J. Exp. Path. and Par.* 4: 15-26.
- Anonim. 2007. T47D. Human ductal breast epithelial tumor cell line. Whole Cell Lysate datasheet. <http://www.abcam.com/index.html?datasheet=14899>. diakses Oktober 2011.
- Anonim. 2009. In Vitro Test Protocol, Cancer Chemoprevention Research Center <http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/en/>. diakses tanggal 10 Juli 2013.
- Burdall, E.S., Hanby M.A., Landsdown, R.J.M., and Speirs, V. 2003. Breast Cancer Cell Line. *Breast Cancer Res.*, 5 (2): 89-95.
- Campbell, N.A., Jane B. Reece, Lisa A. Urry, Michael L. Cain, Steven A. Wasserman, Peter V. Minorsky, and Robert B. Jackson. 2008. *Biology*. 8th edition. Pearson Education, Inc. San Francisco. pp. 738-821.
- Coll, J. C. and B. F. Bowden. 1986. The Application of Vacuum Liquid Chromatography to The Separation of Terpene Mixtures. *J. Nat. Prod.* 49 (5):934-936.
- Dewick, P. M. 2009. *Medical Natural Products : A Biosynthesis Approach*, John Wiley and Sons Ltd. Chichester. pp. 7-48.
- Felth, J. 2011. *Studies of Cytotoxic Compounds of Natural Origin and Their Mechanism of Action*. Dissertations. University of Uppsala.
- Gonzales, A.D., P.G. Lopez, L.A. Herrera, J.L. Medina-Franco, A. Gonzales-Fierro, N. Candelaria. 2008. The Prince and The Pauper: A Tale of Anticancer Targeted Agents. *Mol. Cancer*. 7: 82
- Greenwood E. M., M. Cuendet, D. Sher, D. Gustin, W. Stock and J. M. Pezzuto. 2002. Brusatol-Mediated Induction of Leukemic Cell Differentiation and G1 Arrest is Associated With Down-Regulation Of C-Myc. *Leukimia*. 16 : 2275-2284.
- Kim, I. H., Y. Hitotsuyanagi and K. Takeya, 2004, Quassinoid Glycosides from seeds of *Brucea amarissima*. *Phytochem.* 65 : 3167-3173.
- Kim, I.H. Satoru Takashima, Yukio Hitotsuyanagi, Tomoyo Hasuda, and Koichi Takeya.. 2004. New Quassinoids, Javanicolides C and D and Javanicosides B-F, from Seeds of *Brucea javanica*. *J. Nat. Prod.* 67, 863-868
- Kitagawa, I., T. Mahmud, P. Simanjuntak, K. Hori, T. Uji and H. Shibuya. 1994. Indonesian Medicinal Plants. VIII. Chemical Structures of Three New Triterpenoids, Bruceajavanin A, Dihydrobruceajavanin A, and Bruceajavnin B, and a New Alkaloid Glycoside, Bruceacanthoside from the Stem of *Brucea javanica* (Simaroubaceae). *Chem. Pharm. Bull.* 42 (7) : 1416-1421.
- Khoyaiklang, P., C. Hahnvajjanawong, P. Laupatarakasem, B. Sripa, S. Ubol and V. Lulitanond. 2005. Cytotoxicity of *Brucea javanica* (L.) Merr. on Human Cholangiocarcinoma Cell Lines. <http://www.scholar.com/scholar>. Diakses Juli 2010.
- Lau, F. Y. 2005. Antiproliferative and apoptosis-inducing activity of *Brucea javanica* extract on human carcinoma cells, *Intl J Mol. Med.* 16 : 1157-1162.
- Moejopawiro, S, TR. Nuringtyas, R. Noveriza, dan O. Trisilawati. 2007. *Kajian bioaktif anti kanker 3 varietas buah merah: Identifikasi fraksi bioaktif antikanker payudara dan kanker rahim dan mikrobia kontaminan pada 3 varietas buah merah (Pandanus conoideus Lamk)*. Laporan hasil penelitian kerjasama UGM dengan Sekretariat Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian.
- Nafrialdi dan S. Gan. 2007. *Antikanker dalam Farmakologi dan Terapi*. Edisi 5. Departemen Farmakologi dan Terapeutik. Jakarta.
- Nugroho, L. H. and R. Verpoorte. 2002. Secondary Metabolism in Tobacco. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 68 : 105-125.
- Nyireddy, S. 2003. Thin Layer Chromatography. In *Handbook of Thin-Layer Chromatography*. Third Edition, Revised and Expanded edited by Joseph Sherma and Bernard Fried. Marcel Dekker. New York. pp. 302-323.
- Pelletier, S.W., Hitesh P. Choksi and Haridutt K. Desai. 1986. Separation of Diterpenoid Alkaloid Mixtures Using Vacuum Liquid Chromatography. *J of Nat Prod.* 49 (5): 892-900.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Edisi Keenam. Terjemahan oleh Kosasih Padmawinata. ITB Press. Bandung. pp. 90-105.
- Sakaki, T., S. Yoshimura, M. Ishibashi, T. Tsuyuki T. Takahashi, T. Honda and T. Nakanishi. 1984. New Quassinoid Glycosides, Yadaziosides A-H, from *Brucea javanica*, *Chem. Pharm. Bull.* 32 (11) : 4702-4705.
- Sakaki, T., S. Yoshimura, M. Ishibashi, T. Tsuyuki, T. Takahashi, T. Honda and T. Nakanishi. 1985. Structures of New Quassinoid Glycosides, Yadanzioides A, B, C, D, E, G, H, and New Quassinoid, Dehydrobrusatol and Dehydrobruceantanol from *Brucea javanica* (L.) Merr. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 58 (9): 2680-2686.
- Sakaki, T., S. Yashimura, T. Tsuyuki, T. Takahashi, T. Honda and T. Nakanishi. 1986. Structures of Yadanzioides K, M, N, and O, New Quassinoid Glycosides from *Brucea javanica*. *Bull.Chem. Soc. Jpn.* 59 (11) : 3541-3546.
- Sherma, J. 2003. Basic TLC Techniques, Materials, and Apparatus. In *Handbook of Thin-Layer Chromatography*. Third Edition. edited by Joseph Sherma and Bernard Fried. Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 1-46
- Sonlimar, M., Sismindari dan Mustofa. 2002. Uji Sitotoksik In Vitro Ekstrak Kloroform *Brucea javanica* (L.) Merr, Ipomoea batatas Poir, Mussaenda pubescens Ait. F., dan Portulaca oleracea L. Terhadap Sel HeLa. *Majalah Farmasi Indonesia*. 13 (4) : 215-222.
- Subeki, H. Matsuura, K. Takahashi, K. Nabeta, M. Yamasaki, Y. Maede, and K. Katakura. 2007. Screening of Indonesian Medicinal Plant Extracts for Antibabesal Activity and Isolation of New Quassinoid from *Brucea javanica*. *J. Nat. Prod.* 70 (10) : 1654-1657.

Wardoyo, E. R. P., L. H. Nugroho, and Y.I. Yanti, 2009. Cytotoxic Assay of Chloroform and Methanol Extract of *Brucea javanica* (L.) Merr. On Cervix Cancer (HeLa), International Conference on Biological Science, Faculty of Biology, Gadjah Mada University. Yogyakarta.

Wardoyo E. R. P., L.H. Nugroho, Santosa dan S. Moeljopawiro. Efek Sitotoksik Ekstrak Kloroform, Metanol dan Air Buah *Brucea javanica* (L.) Merr.

terhadap Sel Kanker Payudara T47D. *Berkala Penelitian Hayati*. 4D : 13-16.

Wilson, V.S, Bobseine, K. and Gray EL. 2004. Development and Characterization of a Cell Line That Stably Expresses an Estrogen-Responsive Luciferase Reporter for the Detection of Estrogen Receptor Agonist and Antagonists. *Toxicol Sci*. 81(1): 69-77. _____