

**AKTIVITAS ANTIKANKER *Acalypha wilkesiana* Mull.Arg., *Ziziphus nummularia* (Burm.f.) Wight & Arn., DAN *Glochidion zeylanicum* (Gaertn.) A.Juss. TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA MCF-7**

**ANTICANCER ACTIVITY OF *Acalypha wilkesiana* Mull.Arg., *Ziziphus nummularia* (Burm.f.) Wight & Arn., AND *Glochidion zeylanicum* (Gaertn.) A.Juss. ON MCF-7 BREAST CANCER CELL LINE**

**Ika Yanti M. Sholikhah<sup>1</sup>, Sari Haryanti<sup>1</sup>, Mery Budiarti<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Tawangmangu, Surakarta

Naskah diterima tanggal 24 Desember 2019

**ABSTRACT**

*Akalifa (Acalypha wilkesiana), bidara (Ziziphus nummularia), and glosidion (Glochidion zeylanicum) have been used to treat cancer in several ethnics in Indonesia. The plants are potential candidates as anticancer drug development. The purpose of the study was to examine the effect of 3 medicinal plants on cell viability, cell cycle, and apoptosis in human breast cancer MCF-7. The plants were macerated with 96% ethanol, fractionation was done by liquid-liquid partition using hexane, ethyl acetate, and methanol. Cytotoxic activity was carried out using the MTT assay. Cell cycle profile and apoptosis induction were observed by flow cytometry. Akalifa extract performed the strongest cytotoxic effect on MCF-7 cells with the IC<sub>50</sub> values of 163,38 µg/ml. Among 3 fractions, the hexane fraction of akalifa exhibited the highest cytotoxic activity with the IC<sub>50</sub> of 122,01 µg/ml. Yet the fraction has no effects on cell cycle and apoptosis.*

**Keywords:** anticancer, *Acalypha wilkesiana*, *Ziziphus nummularia*, *Glochidion zeylanicum*, MCF-7

**ABSTRAK**

*Akalifa (Acalypha wilkesiana), bidara (Ziziphus nummularia), dan glosidion (Glochidion zeylanicum) merupakan tanaman yang diketahui sudah digunakan oleh beberapa etnis di Indonesia untuk mengobati kanker. Tumbuhan tersebut sangat potensial dikembangkan lebih lanjut untuk penemuan senyawa baru berkhasiat antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek 3 tumbuhan uji terhadap viabilitas sel, siklus sel, dan apoptosis pada sel kanker payudara MCF-7. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%, sedangkan fraksinasi dengan metode partisi cair cair menggunakan pelarut heksan, etil asetat, dan metanol. Uji aktivitas sitotoksik dilakukan pada sel kanker payudara MCF-7 dengan metode MTT, uji penghambatan siklus sel dan induksi apoptosis dengan metode *flow cytometry*. Hasil uji sitotoksik menunjukkan bahwa ekstrak akalifa memiliki aktivitas sitotoksik tertinggi dengan nilai IC<sub>50</sub> 163,38 µg/ml. Hasil uji sitotoksik fraksi akalifa menunjukkan bahwa fraksi heksan memiliki aktivitas sitotoksik tertinggi dengan nilai IC<sub>50</sub> 122,01 µg/ml pada sel MCF-7. Namun fraksi aktif tersebut tidak mempengaruhi profil siklus sel dan apoptosis.*

**Kata Kunci :** antikanker, *Acalypha wilkesiana*, *Ziziphus nummularia*, *Glochidion zeylanicum*, MCF-7

**PENDAHULUAN**

Perkembangan sel kanker berhubungan dengan perubahan genom dari suatu sel sehingga terjadi pertumbuhan sel mutan secara tidak terkontrol yang mampu menginvasi dan

menghancurkan sel-sel normal tubuh. Menurut data SIRS (Sistem Informasi Rumah Sakit) tahun 2007, kanker payudara merupakan kasus terbanyak (16,85%) yang diderita pasien rawat inap di seluruh rumah sakit di Indonesia (Kementerian Kesehatan, 2013). Estimasi kejadian kanker payudara di dunia hingga tahun 2012 mencapai 1,7 juta kasus, setara dengan 43

kasus per 100.000 wanita. Hampir 24% dari semua kasus terjadi di region Asia-Pasifik (30.000 per 100.000 wanita). Hingga tahun 2012, angka kematian karena kanker payudara berada pada kisaran 41% di China, 17% di Indonesia, dan 12% di Jepang (Youlden dkk., 2014).

Senyawa isolat maupun produk derivat yang berasal dari tumbuhan, seperti vinkristin, vinblastin, dan taksan terbukti efektif dan aman digunakan dalam terapi kanker payudara saat ini. Namun demikian, etiologi dan patologi sel kanker berkembang dengan cepat dan cukup kompleks, yang kemudian mengakibatkan terjadinya resistensi, efek samping, penurunan daya efikasi, dan inefisiensi kemoterapi. Sebagai contoh adalah subtype triple negative, merupakan jenis kanker payudara agresif yang mematikan dan menunjukkan resistensi terhadap kemoterapi antrasiklin dan taksan (André dan Zielinski, 2012). Inovasi manajemen terapi kanker yang berkesinambungan dan komprehensif masih sangat diperlukan untuk meningkatkan keberhasilan penyembuhan, mengurangi angka kematian, dan meningkatkan kualitas hidup penderita.

Salah satu metode pembaruan terapi kanker yang potensial adalah melalui riset eksplorasi dan identifikasi senyawa dengan aktivitas antikanker dari tumbuhan (Naithani dkk., 2008). Tumbuhan beraneka spesies dengan keragaman manfaat obat di berbagai etnis di Indonesia, merupakan kekayaan yang potensial untuk terus digali dan dikembangkan menjadi agen terapi kanker berbasis riset. Berdasarkan data Riset Tumbuhan Obat dan Jamu (Ristoja), telah dilakukan penelitian aktivitas sitotoksik terhadap 141 bagian tumbuhan pada model sel kanker payudara MCF-7. Hasil penelitian menunjukkan terdapat 3 bagian tumbuhan, yaitu daun *Acalypha wilkesiana* Mull.Arg. (akalifa), herba *Ziziphus nummularia* (Burm.f.) Wight & Arn. (bidara), dan daun *Glochidion zeylanicum* (Gaertn.) A.Juss. (glosidion) yang berpotensi dikembangkan lebih lanjut ke arah penemuan agen kemopreventif baru.

Kemopreventif didefinisikan sebagai suatu substansi yang dapat membalikkan, menekan, dan atau mencegah perkembangan karsinogenesis lebih lanjut (Tsao dkk., 2004). Karakteristik sel kanker yang dapat digunakan sebagai target penting dalam kemoprevensi adalah siklus sel untuk menghambat proliferasi sekaligus memacu terjadinya apoptosis. Target lain yang cukup penting adalah metastasis, melalui penghambatan proses molekuler migrasi sel dan protease yang berperan dalam invasi sel (Hanahan dan Weinberg, 2011). Berdasarkan uraian di atas, penting dilakukan penelitian sebagai upaya penemuan agen kemopreventif baru yang dapat mematikan sel kanker melalui

target penghambatan proliferasi dan metastasis. Agen tersebut diharapkan dapat menjadi agen kokemoterapi yang handal, meningkatkan efektivitas dan efisiensi terapi, serta meningkatkan kualitas hidup penderita kanker payudara.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas 3 tumbuhan hasil penelitian Ristojayang berpotensi sebagai agen kemopreventif melalui target aksi penghambatan proliferasi, apoptosis, dan siklus sel dengan model sel kanker payudara MCF-7. MCF-7 adalah salah satu model sel kanker payudara dengan ekspresi ER $\alpha$  positif (Simstein dkk., 2003), populer digunakan karena sensitivitasnya terhadap hormon yang cukup sempurna, melalui ekspresi reseptor estrogen (ER) (Holliday dan Speirs, 2011). MCF-7 menunjukkan peningkatan ekspresi p-53 wild type. Protein tersebut berperan penting pada rendahnya prognosis kanker payudara (Vojtesek dan Lane, 1993). Sel MCF-7 yang digunakan dalam penelitian ini, diharapkan dapat merepresentasikan sifat-sifat kompleksitas kanker payudara yang terjadi pada manusia.

## METODE PENELITIAN

### Alat

Inkubator CO<sub>2</sub> (Sanyo), sentrifus (Biosan), mikroskop *inverted* (Olympus), *microplate reader* (Biorad), *flowcytometer* (BD Accuri C6).

### Bahan

Simplisia tumbuhan uji berupa daun akalifa yang diperoleh dari daerah Karanganyar, herba bidara yang berasal dari Kulon Progo Yogyakarta, dan daun glosidion dari Magelang. Reagen yang digunakan yaitu etanol 96% teknis, akuades, heksan p.a. (Merck), etilasetat p.a. (Merck), metanol p.a. (Merck), kloroform p.a. (Merck), asam sulfat pekat, pereaksi Dragendorf, pereaksi sitroborat, lempeng lapis tipis silika gel F254 (Merck), dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma), sel MCF-7, phosphate-buffered saline (PBS) (Sigma), Dulbecco Modified Eagle Media (DMEM) (Gibco), Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma), penisilin-streptomisin 1% (v/v) (Sigma), tripsin-EDTA 0,25% (Sigma), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma), sodium dodecyl sulphate (SDS) 10% dalam HCl 0,1 N (Sigma), propidium iodide (PI) (Sigma), RNase (Sigma), Triton-X 100 (Sigma), FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD).

### Metode

#### 1. Ekstraksi dan Fraksinasi Tumbuhan Uji

Serbuk tumbuhan uji diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% selama 3x24 jam, rendaman disaring sehingga diperoleh maserat. Maserat yang diperoleh diuapkan pelarutnya dengan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak kental. Pengeringan ekstrak dilanjutkan di dalam oven

suhu 40°C. Ekstrak dilarutkan dalam air hangat (1:1), kemudian difraksinasi bertingkat menggunakan corong pisah dengan pelarut n-heksan, etil asetat, dan metanol. Masing-masing fraksi yang diperoleh kemudian diuapkan dengan rotary evaporator dilanjutkan dalam oven suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kering.

## 2. Profil kromatografi lapis tipis (KLT) ekstrak dan fraksi

Ekstrak dan fraksi aktif dilakukan penetapan profil kromatografi lapis tipis. Fase diam menggunakan plat KLT Silika gel F254. Golongan terpenoid menggunakan fase gerak heksan-etil asetat (1:1), visualisasi bisa dilakukan pereaksi asam sulfat pekat 10% dalam metanol. Golongan alkaloid menggunakan fase gerak etil asetat:metanol:air (100:13,5:10), visualisasi dengan pereaksi Dragendorf. Golongan flavonoid dengan fase gerak kloroform:etil asetat (6:4), visualisasi dengan pereaksi sitroborat.

## 3. Uji sitotoksik (MTT Assay)

Uji sitotoksik dilakukan melalui pengamatan viabilitas sel kanker payudara MCF-7 dengan *MTT assay*. Kultur sel yang telah konfluen dipanen kemudian didistribusikan ke dalam sumuran *96-well microplate* dengan jumlah  $10^4$  sel/sumuran. Sel tersebut diinkubasi selama 24 jam di dalam inkubator CO<sub>2</sub> agar dapat beradaptasi sehingga siap untuk perlakuan. Larutan uji dibuat stok dalam pelarut DMSO kemudian diencerkan menggunakan media kultur sesuai seri konsentrasi yang ditentukan. Sel dicuci dengan PBS kemudian larutan uji dimasukkan ke dalam sumuran (triplo). Sel diinkubasi kembali selama 24 jam di dalam inkubator CO<sub>2</sub>. Setelah inkubasi, larutan uji dibuang dan ditambahkan pereaksi MTT sejumlah 100 µl/sumuran. Pereaksi stopper berupa SDS 10% dalam HCl 0,01 N ditambahkan setelah 4 jam inkubasi dengan MTT. Sel diinkubasi semalam pada suhu kamar dan terlindung dari cahaya. Pada akhir inkubasi, dibaca dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm (Mosmann, 1983).

## 4. Uji penghambatan siklus sel dan induksi apoptosis

Uji ini dilakukan pada fraksi aktif. Kultur sel yang telah konfluen didistribusikan ke *6 well plate* masing-masing 1000 µl (untuk perlakuan dan untuk kontrol sel). Setelah inkubasi 24 jam, dilakukan pembuatan seri konsentrasi fraksi aktif. Sel dicuci dengan PBS, dan 1000 µl larutan fraksi aktif dengan seri konsentrasi tertentu dimasukkan ke dalam sumuran. Sebagai kontrol sel, ditambahkan 1000 µl media kultur ke dalam sumuran. Sel diinkubasi kembali selama 24 jam di dalam inkubator CO<sub>2</sub>. Setelah inkubasi, media dari sumuran *6 well plate* dimasukkan ke conical tube, lalu dicuci dengan 500 µl PBS dan hasil pencucian dimasukkan ke *conical tube* yang

sama. Selanjutnya, ditambahkan 200 µl tripsin-EDTA 0,25% inkubasi selama 3 menit. Kemudian, ditambahkan 1000 µl medium kultur dan diresuspensi sampai sel lepas satu per satu, sel kemudian ditransfer ke *conical* dan disentrifus dengan kecepatan 2000 rpm selama 3 menit. Untuk pengamatan siklus sel, endapan sel dalam tabung konikal yang ditutup dengan aluminium foil dilarutkan dengan 400 µl reagen PI yang mengandung 1 mg/ml PI, 10 mg/ml RNase dan 0,1% (v/v) Triton-X 100. Sel diresuspensikan dan diinkubasi 5 menit kemudian suspensi sel ditransfer ke dalam tabung *flowcytometry* dan dianalisis (Ayers dkk., 2011). Untuk pengamatan apoptosis, supernatan dibuang kemudian ditambahkan 100 µl Annexin-V-FLUOS staining yang terdiri atas 100 µl binding buffer, 2 µl Anexin V dan 2 µl PI. Kemudian diinkubasi dalam ruang gelap selama 10 menit dan selanjutnya running pada flowcytometer (Van Engeland dkk., 1996).

## Analisis Data

Data berupa viabilitas sel digunakan untuk menghitung IC<sub>50</sub> menggunakan analisis regresi linier dengan program Microsoft Excel 2013. Data hasil *flowcytometry* dianalisis dengan BD Accuri C6 software.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji sitotoksik dilakukan untuk memperoleh gambaran aktivitas bahan uji terhadap penghambatan proliferasi sel kanker payudara MCF-7. Parameter yang digunakan adalah inhibition concentration 50% (IC<sub>50</sub>), yaitu konsentrasi yang dapat menghambat proliferasi sel sebesar 50% dari populasi sel. Nilai IC<sub>50</sub> dihitung dari hasil regresi linier antara log konsentrasi dengan persentase viabilitas sel. Hasil perhitungan nilai IC<sub>50</sub> disajikan pada Tabel 1 dan 2. Berdasarkan viabilitas sel, masing-masing perlakuan ekstrak menunjukkan hubungan yang linier antara konsentrasi dan aktivitas penghambatan proliferasi sel.

Tabel 1 menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun akalifa memiliki aktivitas sitotoksik paling kuat dengan nilai IC<sub>50</sub> di bawah 200 µg/ml, yaitu 163,38 µg/ml. Dua bahan uji lainnya, ekstrak etanol herba bidara dan daun glosidion, menunjukkan nilai IC<sub>50</sub> di atas 200 µg/ml.

**Tabel 1. Nilai IC<sub>50</sub> ekstrak etanol daun akalifa, herba bidara, dan daun glosidion pada sel MCF-7**

Ekstrak	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
Daun akalifa	163,38
Herba bidara	222,98
Daun glosidion	528,73



**Tabel 2. Nilai IC<sub>50</sub> fraksi heksan, etil asetat, dan metanol daun akalifa pada sel MCF-7**

Fraksi	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
Heksan	122,01
Etil asetat	161,23
Metanol	222,98

Sehingga ekstrak akalifa merupakan ekstrak yang paling potensial dikembangkan sebagai agen kemopreventif. Hasil pengamatan morfologi sel yang ditampilkan pada Gambar 1 menunjukkan bahwa ekstrak akalifa mengakibatkan perubahan morfologi sel dibandingkan dengan kontrol sel. Dari Gambar 1 tersebut nampak adanya penghambatan proliferasi pada sel yang diberi perlakuan ekstrak akalifa. Perubahan morfologi sel paling nampak pada pemberian ekstrak akalifa konsentrasi 100 µg/ml. Perubahan tersebut berupa menyusutnya ukuran sel, sel tampak mengapung, dan terlepasnya ikatan antar sel. Penghambatan proliferasi sel dan perubahan morfologi sel tersebut mengindikasikan kematian sel, secara apoptosis maupun nekrosis.

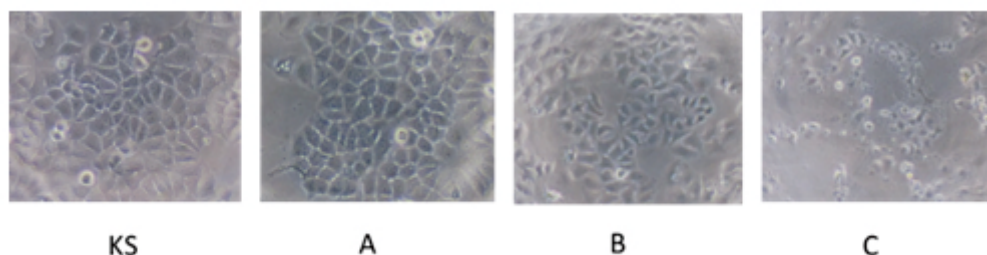
Selanjutnya ekstrak akalifa difraksinasi dengan metode partisi cair-cair menggunakan pelarut bertingkat heksan, etil asetat, dan metanol untuk melakukan pemisahan senyawa berdasarkan kepolarannya. Masing-masing fraksi diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel kanker payudara MCF-7. Nilai IC<sub>50</sub> masing-masing fraksi dirangkum pada Tabel 2. Hasil uji sitotoksik menunjukkan bahwa fraksi heksan akalifa memiliki aktivitas penghambatan proliferasi tertinggi dengan nilai IC<sub>50</sub> 122,01 µg/ml, paling kecil dibandingkan 2 fraksi lainnya. Hal ini berarti fraksi heksan akalifa bersifat lebih poten dibandingkan 2 fraksi lainnya. Potensi fraksi tersebut perlu diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel normal atau non kanker untuk melengkapi data keamanannya sehingga bisa dikembangkan lebih lanjut sebagai agen antikanker.

Penelitian sebelumnya menyatakan

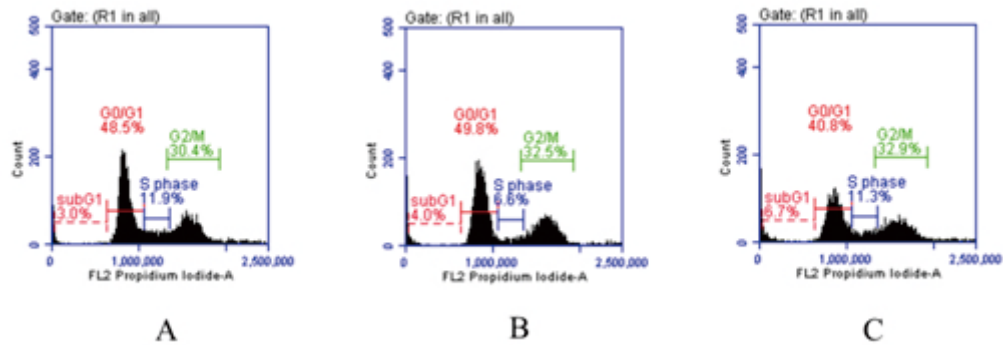
bahwa ekstrak etil asetat dan heksan dari *Acalypha wilkesiana* memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker otak U87MG dan sel kanker paru-paru A549 (Lim, dkk., 2011). Hal ini menguatkan kemungkinan bahwa senyawa yang memiliki aktivitas sitotoksik pada tumbuhan akalifa adalah senyawa yang bersifat non polar karena larut dalam heksan. Penelitian lain juga mengungkapkan bahwa ekstrak etil asetat biji akalifa memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker hati HepG2 dan sel kanker payudara MCF-7. Senyawa yang diduga bertanggung jawab dalam aktivitas tersebut adalah ellagitannin, geraniin, korilagin, punikalina, dan turunan asam karboksilat brevifolin (El-raey, dkk., 2016).

Uji sitotoksitas dengan MTT assay hanya mampu menjelaskan aktivitas ekstrak maupun fraksi dalam menghambat pertumbuhan sel kanker dengan parameter IC<sub>50</sub>. Nilai IC<sub>50</sub> dan perubahan morfologi sel belum bisa merepresentasikan penyebab kematian sel. Oleh karena itu, dilakukan uji penghambatan siklus sel dan induksi apoptosis dengan metode *flow cytometry*. Siklus sel merupakan pengatur proliferasi dan pertumbuhan sel, termasuk pembelahan sel setelah kerusakan DNA. Siklus sel mengatur transisi dari fase *quiescence* (G0) menuju proliferasi sel, dan melalui berbagai *checkpoint*, memastikan keberlangsungan transkripsi genetik. Penghambatan siklus sel merupakan mekanisme pertahanan hidup sel dengan cara memperbaiki kerusakan DNA. Saat *checkpoint* tidak berfungsi dan perbaikan DNA belum selesai, terjadi aktivasi sinyal apoptosis (Schwartz dan Shah, 2005).

Uji penghambatan siklus sel dan induksi apoptosis dilakukan terhadap fraksi paling aktif yang menunjukkan aktivitas sitotoksik tertinggi yaitu fraksi heksan daun akalifa. Analisis siklus sel dilakukan dengan metode *flow cytometry* untuk memperlihatkan persentase sel hidup di setiap fase siklus sel. Hasil pengamatan profil siklus sel dapat dilihat pada Gambar 2. Dari Gambar 2 tersebut diketahui bahwa perlakuan fraksi heksan akalifa konsentrasi 60 dan 120 µg/ml tidak mempengaruhi profil siklus sel MCF-7 secara keseluruhan. Pengamatan siklus sel dengan reagen PI untuk mengamati efek



**Gambar 1. Morfologi sel MCF-7 dengan perlakuan ekstrak akalifa konsentrasi 5 (A), 25 (B), dan 100 (C) µg/ml dibandingkan dengan kontrol sel (KS)**



**Gambar 2. Profil siklus sel MCF-7 dengan perlakuan fraksi heksan akalifa konsentrasi 60 µg/ml (B) dan 120 µg/ml (C) dibandingkan dengan kontrol sel (A)**

perlakuan fraksi heksan akalifa terhadap persentase sel hidup pada setiap fase siklus sel menunjukkan tidak ada perubahan yang bermakna dibandingkan dengan kontrol sel, baik pada fase sub G1, G0/G1, S, maupun G2/M. Penghambatan siklus sel pada fase tertentu menyebabkan resistensi sel terhadap suatu agen kemoterapi, sehingga mekanisme induksi apoptosis diperlukan untuk mengatasi hal tersebut (Shah dan Schwartz, 2001).

Apoptosis merupakan kematian sel terprogram yang memegang peranan penting dalam menjaga homeostasis jaringan normal. Apoptosis mengeliminasi sel yang tidak diperlukan dalam rangka menjaga keseimbangan fisiologis antara sel yang bertahan hidup dan sel yang mati. Kekurangan apoptosis bisa mengakibatkan terjadinya kanker maupun penyakit autoimun, sedangkan apoptosis yang berlebihan menyebabkan penyakit degeneratif kronis, imunodefisiensi, dan infertilitas (Hassan dkk., 2014).

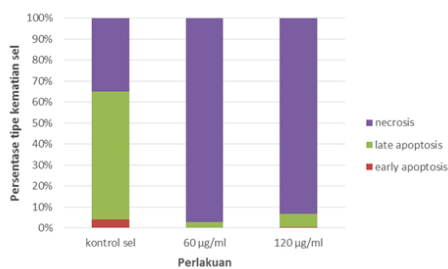
Apoptosis memegang peranan penting dalam pengobatan kanker karena merupakan salah satu target terapi kanker. Beberapa mekanisme terkait berkurangnya insidensi apoptosis antara lain adalah ketidakseimbangan

antara protein pro-apoptosis dan anti-apoptosis, menurunnya ekspresi caspase, serta terganggunya sinyal reseptor kematian sel (Wong, 2011). Selain itu, pada apoptosis juga terjadi serangkaian perubahan biokimia yang meliputi aktivasi caspase, pemecahan DNA dan protein, serta modifikasi permukaan membran sel (Koff, dkk., 2015).

Ketika sel menua atau rusak, sel tersebut mengalami kematian melalui mekanisme apoptosis, nekrosis, ataupun keduanya dan digantikan oleh sel-sel baru. Sel kanker bisa bersifat immortal karena adanya resistensi terhadap apoptosis. Agen kemoterapi bisa membunuh sel kanker melalui mekanisme apoptosis maupun nekrosis (Behera dkk., 2016). Pada penelitian ini, efek induksi apoptosis dari fraksi heksan akalifa terhadap sel kanker payudara MCF-7 diamati dengan pewarnaan Annexin-V dan PI menggunakan metode flow cytometry. Annexin-V merupakan protein yang dapat terkonjugasi pada pewarna fluorescent hijau untuk mendeteksi apoptosis, sedangkan PI merupakan pewarna fluorescent merah yang dapat mewarnai DNA pada sel yang mengalami nekrosis dan apoptosis awal dengan kerusakan membran (Mahassni dkk., 2013).

Perlakuan fraksi heksan akalifa konsentrasi 60 dan 120 µg/ml pada sel MCF-7 menunjukkan terjadinya late apoptosis namun persentasenya jauh lebih kecil dibandingkan dengan kontrol sel, sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 3. Hal ini diduga karena mekanisme fraksi heksan akalifa dalam membunuh sel kanker adalah tanpa melalui jalur apoptosis, tetapi melalui mekanisme nekrosis. Namun dugaan ini perlu dibuktikan lebih lanjut dengan mencoba perlakuan fraksi heksan akalifa dengan konsentrasi yang diperkecil dan waktu inkubasi yang lebih lama.

Penetapan profil kromatografi lapis tipis pada ekstrak dan fraksi akalifa menunjukkan bahwa tumbuhan tersebut mengandung alkaloid, terpenoid, dan flavonoid. Dari hasil penelitian



**Gambar 3. Persentase apoptosis dan nekrosis sel MCF-7 dengan perlakuan fraksi heksan akalifa konsentrasi 60 µg/ml dan 120 µg/ml dibandingkan dengan kontrol sel**

sebelumnya (Madziga dkk. 2010) diketahui bahwa ekstrak air daun akalifa mengandung karbohidrat, tanin, dan flavonoid dalam jumlah tinggi; saponin, alkaloid, dan glikosida dalam jumlah sedang; serta terpen dan steroid dalam jumlah kecil.

Flavonoid merupakan salah satu golongan senyawa yang terbukti memiliki efek antikanker. Vijayalakshmi dkk. (2013) menemukan bahwa fraksi flavonoid yang diperoleh dengan cara kromatografi kolom dari herba *Cissus quadrangularis* memiliki potensi sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 dengan nilai  $IC_{50}$  40  $\mu\text{g/ml}$ . Mekanisme aksi flavonoid sebagai agen antikanker meliputi penghambatan proliferasi sel, penghambatan aktivitas protein kinase, induksi apoptosis, penghambatan sekresi MMP, penghambatan invasi sel, penghambatan penempelan sel, serta antiangiogenesis (Kanadaswami dkk., 2005). Dari profil KLT ekstrak dan fraksi heksan akalifa, diketahui adanya golongan senyawa flavonoid. Sehingga dapat diduga bahwa flavonoid yang terkandung dalam daun akalifa bertanggung jawab terhadap aktivitas sitotoksik.

## KESIMPULAN

Daun akalifa memiliki potensi yang lebih besar untuk dikembangkan sebagai obat antikanker dibandingkan herba bidara dan daun glosidion. Ekstrak etanol akalifa dan fraksi heksan akalifa memiliki aktivitas penghambatan proliferasi tertinggi dengan nilai  $IC_{50}$  masing-masing sebesar 163,38  $\mu\text{g/ml}$  dan 122,01  $\mu\text{g/ml}$ . Namun fraksi heksan akalifa tidak mempengaruhi apoptosis dan profil siklus sel MCF-7.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional yang telah memberikan kesempatan dan dukungan untuk melaksanakan penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- André, F. dan Zielinski, C.C., 2012. Optimal strategies for the treatment of metastatic triple-negative breast cancer with currently approved agents. *Annals of Oncology*, 23: vi46–vi51.
- Ayers, L., Kohler, M., Harrison, P., Sargent, I., Dragovic, R., Schaap, M., 2011. Measurement of circulating cell-derived microparticles by flow cytometry: sources of variability within the assay. *Thrombosis Research*, 127: 370–377.
- Bao, L., Haque, A., Jackson, K., Hazari, S., Moroz, K., Jetly, R., 2011. Increased Expression of P-Glycoprotein Is Associated with Doxorubicin Chemoresistance in the Metastatic 4T1 Breast Cancer Model. *The American Journal of Pathology*, 178: 838–852.
- Behera, Bandana, Jyoshna Dash, Debasish Pradhan, Gitanjali Tripathy, Rakesh Pradhan. Apoptosis and Necrosis of Human Breast Cancer Cells by an Aqueous Extract of *Euphorbia hirta* leaves. *Journal of Young Pharmacists*, 8(3):186-193.
- Doyle, A. dan Griffiths, J.B., 2000. *Cell and Tissue Culture for Medical Research*. Wiley.
- El-raey, Mohamed A, Tahia K Mohamed, Walaa A. El-kasha2, Walid O. Fayad. 2016. Phenolic Constituents and Biological Activities of *Acalypha wilkesiana* F. Tricolor Müll. Arg. Seeds. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8(3): 386-392.
- Girish, V. dan Vijayalakshmi, A., 2004. Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ. *Indian Journal of Cancer*, 41: 47.
- Hanahan, D. dan Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144: 646–674.
- Mohamed Hassan, Hidemichi Watari, Ali AbuAlmaaty, Yusuke Ohba, and Noriaki Sakuragi. Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. *BioMed Research International*.
- Hsieh, C.-Y., Tsai, P.-C., Chu, C.-L., Chang, F.-R., Chang, L.S., Wu, Y.C, 2013. Brazilein suppresses migration and invasion of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Chemico-Biological Interactions*, 204: 105–115.
- Kaur, P., Nagaraja, G.M., Zheng, H., Gizachew, D., Galukande, M., Krishnan, S, 2012. A mouse model for triple-negative breast cancer tumor-initiating cells (TNBC-TICs) exhibits similar aggressive phenotype to the human disease. *BMC cancer*, 12: 120.
- Koff, Jean L., Sampath Ramachandiran and Leon Bernal-Mizrachi. 2015. A Time to Kill: Targeting Apoptosis in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 16:2942-2955.
- Lim, S.W., K.N. Ting, T.D. Bradshaw, N.A. Zeenathul, C. Wiart, T.J. Khoo, K.H. Lim, H.S. Loh. 2011. *Acalypha wilkesiana* extracts induce apoptosis by causing single strand and double strand DNA breaks. *Journal of Ethnopharmacology*, 138 (2011): 616–623.
- Lowe, Scott W. and Athena W. Lin. 2000. Apoptosis in Cancer. *Carcinogenesis*, 21(3):485-495.
- Madziga, H. A., Sanni S. and Sandabe U. K. Phytochemical and Elemental Analysis of *Acalypha wilkesiana* Leaf. 2010. *Journal*

- of American Science, 6(11-): 510-514.
- Mahassni, Sawsan Hassan, Roaa Mahdi Al-Reemi. 2013. Apoptosis and necrosis of human breast cancer cells by an aqueous extract of garden cress (*Lepidium sativum*) seeds. *Saudi Journal of Biological Sciences* 20:131–139.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65: 55–63.
- Naithani, R., Huma, L.C., Moriarty, R.M., McCormick, D.L., and Mehta, R.G., 2008. Comprehensive review of cancer chemopreventive agents evaluated in experimental carcinogenesis models and clinical trials. *Current Medicinal Chemistry*, 15: 1044–1071.
- Pulaski, B.A. dan Ostrand-Rosenberg, S., 2001. Mouse 4T1 breast tumor model. *Current Protocols in Immunology/Edited by John E. Coligan, Chapter 20: Unit 20.2*.
- Reynolds, C.P. dan Maurer, B.J., 2005. Evaluating response to antineoplastic drug combinations in tissue culture models. *Methods in Molecular Medicine*, 110: 173–183.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., dan Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9: 671–675.
- Schwartz, Gary K. and Manish A. Shah. 2005. Targeting the Cell Cycle: A New Approach to Cancer Therapy. *Journal Of Clinical Oncology*. 23 (36):9408-9421.
- Shah, Manish A. and Gary K. Schwartz. 2001. Cell Cycle-mediated Drug Resistance: An Emerging Concept in Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, 7:2168–2181.
- Sztalmachova, M., Gumulec, J., Raudenska, M., Polanska, H., Holubova, M., Balvan, J., 2015. Molecular response of 4T1-induced mouse mammary tumours and healthy tissues to zinc treatment. *International Journal of Oncology*.
- Tao, K., Fang, M., Alroy, J., and Sahagian, G.G., 2008. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer*, 8: 228.
- Tsao, A.S., Kim, E.S., dan Hong, W.K., 2004. Chemoprevention of cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*, 54: 150–180.
- Van Engeland, M., Ramaekers, F.C., Schutte, B., dan Reutelingsperger, C.P., 1996. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry*, 24: 131–139.
- Vijayalakshmi, A., P. R. Kumar, S. Sakthi Priyadarsini, and C. Meenaxshi. 2013. In Vitro Antioxidant and Anticancer Activity of Flavonoid Fraction from the Aerial Parts of *Cissus quadrangularis* Linn. against Human Breast Carcinoma Cell Lines. *Journal of Chemistry*, 2013: 1-9.
- Wong, Rebecca SY. 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 30: 87.
- Youlden, D.R., Cramb, S.M., Yip, C.H., dan Baade, P.D., 2014. Incidence and mortality of female breast cancer in the Asia-Pacific region. *Cancer Biology & Medicine*, 11: 101–115ww