

Uji Aktivitas Sitotoksik, Ekspresi p53, dan Bcl-2 dari Ekstrak Fraksi Herba Kelakai (*Stenochleana palustris* (Burm.F.) Bedd.) terhadap Sel Kanker Payudara T47D

Cytotoxic Activity, Expression of p53, and Bcl-2 Extract Fraction of Kelakai Herbs (*Stenochleana palustris* (Burm.F.) Bedd.) to Breast Cancer T47D Cells

Rika Arfiana Safitri^{1*}, Opstaria Saptarini¹, Titik Sunarni¹
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Jalan Let. Jen. Sutoyo, Mojosongo, Surakarta

*E-mail: rika.arfiana8@gmail.com

Diterima: 2 Mei 2020

Direvisi: 13 Juli 2020

Disetujui: 4 September 2020

Abstrak

Kanker payudara merupakan kanker yang menyerang jaringan epitel payudara. Terapi kanker dengan obat-obatan dapat memiliki efek samping sehingga potensi bahan alam mulai dikembangkan sebagai obat antikanker. Herba kelakai (*Stenochleana palustris* (Burm.f.) Bedd.) merupakan bahan alam sebagai alternatif pengobatan kanker. Sel T47D adalah model sel kanker payudara. Tujuan penelitian ini adalah menguji aktivitas sitotoksik ekstrak, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari herba kelakai terhadap sel kanker payudara T47D dan mengetahui pengaruh ekstrak dan fraksi herba kelakai terhadap ekspresi p53 dan Bcl-2. Herba kelakai diekstraksi dengan metode maserasi. Uji sitotoksik dilakukan dengan metode uji *methyl thiazolyl tetrazolium* (MTT) assay pada sel kanker payudara T47D dan *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) reader. Ekspresi p53 dan Bcl-2 dilakukan dengan uji imunositokimia. Fraksi n-heksan dan etil asetat herba kelakai memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dengan nilai IC₅₀ 86,99 µg/mL dan 98,43 µg/mL, sedangkan fraksi air tidak memiliki aktivitas sitotoksik dengan nilai IC₅₀ >1000 µg/mL. Ekstrak dan fraksi n-heksan herba kelakai dapat meningkatkan ekspresi p53 dan menurunkan ekspresi protein Bcl-2.

Kata kunci: Bcl-2, Herba kelakai (*Stenochleana palustris*), p53, sel kanker payudara T47D, sitotoksik

Abstract

Breast cancer is cancer that attacks the epithelial tissue of the breast. Cancer therapy with drugs have side effects to human, so the potency of natural ingredients is developed as anticancer drugs. Kelakai herbs (Stenochleana palustris (Burm.f.) Bedd.) is a natural ingredient as an alternative treatment for cancer. T47D cells are a model for breast cancer cells. This research aims to examine the cytotoxic activity of extracts, n-hexane fraction, ethyl acetate fraction, and water fraction of kelakai herbs against T47D breast cancer cells and to determine the effect of extract and fraction of kelakai herbs to p53 and Bcl-2 expression. The herbs were extracted by maceration method. A cytotoxic test was performed using methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay on T47D breast cancer cells and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) reader. The expression of p53 and Bcl-2 was carried out the immunocytochemical test. The n-hexane and ethyl acetate fractions of kelakai herbs had cytotoxic activity against T47D breast cancer cells with IC₅₀ values of 86.99µg/mL and 98.43µg/mL, the water fraction did not have cytotoxic activity with IC₅₀ values >1000µg/mL. Extract and n-hexane fraction of kelakai herb can increase p53 expression and decrease Bcl-2 protein expression.

Keywords: Bcl-2, the breast cancer T47D cells, cytotoxic, kelakai herbs (*Stenochleana palustris*), p53

Pendahuluan

Kanker merupakan penyakit yang disebabkan karena adanya gen-gen abnormal. Hal ini ditandai dengan adanya sinyal proliferasi secara terus-menerus, rusaknya gen penekan pertumbuhan, dan tidak adanya proses kematian sel. Kemudian terjadi pula replikasi sel yang tidak terkendali, adanya rangsangan angiogenesis, sehingga sel mampu mengalami metastasis, dan menginvasi jaringan disekitarnya¹.

Di Indonesia, prevalensi tumor atau kanker menunjukkan peningkatan dari 1,4 per 1000 penduduk di tahun 2013 menjadi 1,79 per 1000 penduduk pada tahun 2018. Prevalensi kanker tertinggi adalah di provinsi Yogyakarta 4,86 per 1000 penduduk, diikuti Sumatera Barat 2,47 per 1000 penduduk, dan Gorontalo 2,44 per 1000 penduduk².

Kanker payudara merupakan penyakit genetik, akibat akumulasi kelainan genetik dalam jaringan. Pada penderita kanker payudara yang baru terdiagnosa dapat ditemukan adanya mutasi. Sel kanker payudara memiliki beberapa jenis untuk diteliti, salah satunya adalah sel T47D (*human ductal breast epithelial tumor cell line*). Sel T47D adalah model sel kanker payudara yang belum resisten terhadap agen kemoterapi doksorubisin, tetapi diketahui memiliki protein p53 yang telah termutasi. Jika p53 tidak dapat mengikat respon elemen pada *Deoxyribo Nucleic Acid* (DNA), maka akan mengurangi atau menghilangkan kemampuannya dalam meregulasi siklus sel dan menginduksi apoptosis³.

Terapi obat-obat kanker biasanya memiliki efek samping. Adanya efek

samping yang tidak dikehendaki selama pengobatan menggunakan obat antikanker merupakan masalah global dan belum dapat dihindari. Pasien yang menerima obat antikanker kombinasi fluorourasil, doksorubisin, dan siklofosfamid selama pengobatan kanker payudara mengalami kerontokan rambut, perubahan warna kuku, perubahan indra perasa, penurunan nafsu makan, mual, dan ketidaknormalan syaraf⁴.

Penelitian untuk mendapatkan kandidat potensial obat antikanker baru sangat diperlukan untuk menjawab permasalahan tersebut. Saat ini, penelitian terhadap penanganan kanker mulai diarahkan pada pengujian potensi bahan alam sebagai agen kemopreventif. Salah satu tumbuhan yang dapat dikembangkan yaitu herba kelakai (*Stenochleana palustris* (Burm.f.) Bedd.) Berdasarkan penelitian sebelumnya, fraksi etanol dan etil asetat kelakai menunjukkan efek sitotoksik terhadap sel HeLa, dengan nilai *Inhibitor Concentration 50* (IC₅₀) yang sangat aktif yaitu 4,58 dan 8,60 µg/mL⁵. Menurut Chear dkk⁶, daun kelakai yang diteliti terhadap sel kanker payudara *Michigan Cancer Foundation-7* (MCF-7) dan MDA-MB-231 dengan nilai IC₅₀ masing-masing 35 dan 25 µM, sedangkan pada sel kanker prostat DU-145, hasil IC₅₀ 48 µM. Isolasi dari daun kelakai menghasilkan senyawa kaempferol yang bersifat sitotoksik⁷.

Kandungan kimia yang terdapat pada tumbuhan kelakai adalah terpenoid, alkaloid, flavonoid, fenolik, asam folat, dan tanin. Menurut Margono dkk⁸, ekstrak kelakai dilaporkan berpotensi menghambat produksi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF-α). Chai *et al*⁹ melakukan isolasi

fraksi antilglukosida dan antioksidan dari kelakai dengan menggunakan pelarut heksana, kloroform, etil asetat, metanol, dan air. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanol yang paling optimal untuk memperoleh senyawa antilglukosida dan antioksidan. Daun kelakai juga mengandung senyawa bioaktif kaempferol yang memiliki mekanisme menghambat proliferasi sel dan mengatur gen supresor tumor yang berperan penting dalam siklus sel dan p53 pada sel kanker⁷.

Walaupun banyak penelitian tentang herba kelakai sebagai kandidat potensial obat antikanker, tetapi belum ada penelitian mengenai uji sitotoksik yang menguji ekspresi protein p53 dan Bcl-2 pada sel kanker payudara T47D. Oleh sebab itu, tujuan penelitian ini adalah menguji aktivitas sitotoksik ekstrak, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari herba kelakai terhadap sel kanker payudara T47D, dan mengetahui pengaruh ekstrak dan fraksi herba kelakai terhadap ekspresi p53 dan Bcl-2.

Metode

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium yang dilakukan di Laboratorium Fitokimia, Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta dan Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta pada tanggal 30 November 2019 hingga 20 Februari 2020.

Alat yang digunakan adalah alat ekstraksi maserasi, alat identifikasi senyawa aktif, alat *Sterling Bidwell, Moisture Balance* (Ohaus), *sentrifuge* Sigma 3K12 (*B. Braun Biotech International*), *Laminar Air Flow Class II* (*Labconco*), *ELISA reader* (SLT 240

ATC), *Nebauer Haemocytometer* (BDH Merck), *microplate* 96 sumuran (*Biologix*), neraca elektrik, mikropipet 20-200 μ L, dan 200-2000 μ L (*pipetman*), mesin vortex, mikroskop *inverted* (Axiovert-25), *tissue culture flask* (*Nunclone*), inkubator 370 C (Merck), dan kamera *digital*.

Bahan yang digunakan adalah serbuk herba kelakai yang didapatkan dari Kelurahan Panarung, Kecamatan Pahandut, Kota Palangkaraya, Kalimantan Tengah, etanol 96%, reagen identifikasi senyawa aktif, silika gel GF₂₅₄, pereaksi *dragendorff*, FeCl₃, pereaksi vanilin HCl, pereaksi vanilin asam sulfat, pereaksi *Liebermann-Burchard*, *cell line* T47D, sel Vero yang didapatkan dari Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, gen p53 dan Bcl-2, medium kultur *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Gibco), natrium bikarbonat, HEPES (Sigma), *Fetal Bovine Serum* (FBS), penisilin-streptomisin 1% v/v (Gibco), dimetil sulfoksida (DMSO), Tripsin 0,5%, *methyl thiazolyl tetrazolium* (MTT) 5 mg/ml, *Fungizone* 0,5%, larutan *Phosphate Buffered Saline* (PBS) pH 7,2, larutan *Sodium Dodesil Sulfat* (SDS) 10% dalam HCl 0,1 N sebagai stopper, doksorubisin, reagen imunositokimia (metanol, larutan hidrogen peroksida, *novostain universal detection kit*, antibodi monoklonal *prime* p53 dan Bcl-2 (Gibco), *xylol, mounting media*).

Pembuatan serbuk herba kelakai

Batang dan daun kelakai yang diperoleh dikumpulkan sebanyak 10 kg dan disortasi basah kemudian dicuci dengan menggunakan air mengalir. Setelah itu ditiriskan dan dipotong melintang untuk

memperkecil ukuran. Kelakai yang telah dibersihkan dilakukan pengeringan untuk mengurangi kadar air, sehingga mencegah terjadinya pembusukan oleh jamur dan bakteri, menghilangkan aktivitas enzim yang dapat mengurangi zat aktif dan memudahkan proses penggilingan maupun penyimpanan¹⁰.

Pembuatan ekstrak dan fraksi herba kelakai

Herba kelakai sebanyak 1000 g diekstraksi secara maserasi dengan cara direndam menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 800 mL selama 5 hari dan dilakukan pengocokan. Setelah 5 hari disaring dan ampasnya yang tersisa direndam kembali selama 2 hari dengan etanol 96% yang baru sebanyak 200 mL. Filtrat kemudian diuapkan menggunakan evaporator sampai diperoleh ekstrak kental. Sebanyak 5 g ekstrak kental diencerkan dengan etanol-air (1:4), fase air sebanyak 35 mL, kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah, difraksinasi berturut-turut dengan pelarut n-heksan dan etil asetat. Fraksinasi dilakukan hingga warna pelarut jernih. Hasil fraksi pertama, kedua, dan ketiga dikumpulkan secara terpisah. Fraksi lalu diuapkan dengan *rotary evaporator* dan dikentalkan dengan *waterbath*.

Standarisasi ekstrak

Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak etanol herba kelakai dilakukan secara kualitatif dengan uji tabung dan uji penegasan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

Identifikasi flavonoid, simplisia dan ekstrak etanol herba kelakai dilakukan dengan menambahkan 10 mL air panas, kemudian dididihkan selama 5 menit dan

disaring dalam keadaan panas. Kemudian dalam filtrat ditambahkan 0,1 g serbuk magnesium (Mg), 1 mL asam klorida pekat, dan 2 mL amil alkohol. Larutan kemudian dikocok dan dibiarkan terpisah. Flavonoid positif jika terjadi warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol¹¹.

Identifikasi alkaloid dilakukan dengan menambahkan 1 mL asam klorida 2 N dan 9 mL air suling ke dalam sampel herba kelakai, kemudian dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, kemudian didinginkan, dan disaring. Kemudian filtrat yang dihasilkan diuji menggunakan tes alkaloid. Ambil 3 tabung reaksi, lalu ke dalamnya dimasukkan 0,5 mL filtrat. Masing-masing tabung reaksi ditambahkan 2 tetes pereaksi *Mayer*, 2 tetes pereaksi *Bouchardat*, dan 2 tetes pereaksi *Dragendorff*. Uji alkaloid positif jika terjadi endapan atau kekeruhan pada dua dari tiga percobaan yang dilakukan¹¹.

Identifikasi saponin dilakukan dengan menambahkan air panas yang sama banyak ke dalam sampel herba kelakai, kemudian didinginkan lalu dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Uji saponin positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang tetap selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm dan pada penambahan 1 tetes HCl 2N, buih tidak hilang¹¹.

Identifikasi tanin dilakukan dengan memasukkan 0,5 g sampel herba kelakai ke dalam tabung reaksi, kemudian dilarutkan dengan 10 mL akuades. Lalu disaring dan filtrat ditambahkan 3 tetes FeCl₃ 1%. Hasil uji tanin positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kehitaman¹¹.

Identifikasi triterpenoid atau steroid dilakukan dengan menambahkan 1 tetes

Liebermann Burchard (1 mL asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat 1 tetes) ke dalam 0,5 g simplisia dan ekstrak. Uji terpenoid yang positif ditunjukkan dengan adanya cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan. Sedangkan uji steroid yang positif ditunjukkan dengan munculnya cincin biru kehijauan¹¹

Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Pada uji KLT, fase diam yang digunakan adalah silika gel GF₂₅₄. Sampel yang akan diuji dilarutkan dengan pelarut kemudian diteteskan. Bejana kromatografi terlebih dahulu dijenuhkan dengan fase geraknya.

Identifikasi flavonoid dilakukan dengan menggunakan fase gerak n-heksan:etil asetat:asam formiat (6:4:0,2). Perbandingan yang digunakan yaitu kaempferol. Hasil KLT dideteksi dengan pereaksi semprot sitroborat. Hasil positif menunjukkan warna kuning atau jingga¹¹.

Identifikasi alkaloid menggunakan fase gerak etil asetat:metanol:air (90:9:1) dan penampakan noda yang digunakan yaitu *Dragendorf*. Perbandingan yang digunakan adalah kafein. Hasil positif menunjukkan warna jingga¹¹.

Identifikasi saponin menggunakan fase gerak kloroform:metanol:air (60:30:10). Hasil KLT dideteksi menggunakan pereaksi semprot anisaldehyd asam sulfat pekat. Hasil positif ditunjukkan dengan warna biru atau biru violet¹¹.

Identifikasi tanin dilakukan dengan menambahkan eluen yaitu toluena:asetat (3:1) dan pereaksi semprot yang digunakan adalah Ferri sulfat. Hasil positif dengan warna biru kehitaman menandakan

tanin galat sedangkan warna hijau kehitaman menandakan tanin katekol¹¹.

Identifikasi terpenoid/steroid menggunakan fase gerak yaitu n-heksan:etil asetat (7:3). Perbandingan yang digunakan stigma sterol. Hasil KLT dideteksi dengan pereaksi semprot *Liebermann Burchard*. Hasil positif menunjukkan warna ungu sampai kecoklatan¹¹.

Uji aktivitas sitotoksik

Metode yang digunakan dalam pengujian aktivitas sitotoksik adalah uji *microtetrazolium* (MTT) (3-[4,5-dimetilthiazol-2-yl]2, 5-difeniltetrazolium bromide). Larutan uji sebanyak 100 µL disuspensikan dengan 100 µL sel dalam medium RPMI 1640 ditambah dengan FBS 10%, dan penisilin-streptomisin 1% (kepadatan 2x10⁴ sel/sumuran) kemudian dimasukkan ke dalam *microplate* 96. Sel T47D dan sel Vero diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO₂ 5% dengan kelembaban yang sesuai. Sampel dimasukan dalam *plate* dengan variasi kadar 500 µg/mL; 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 31,25 µg/mL; dan 15,6 µg/mL. Selanjutnya sampel diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% selama 24 jam. Sel yang hidup akan bereaksi dengan reagen MTT membentuk warna ungu (formazan). Media sel selanjutnya dibuang, ditambahkan 110 µL reagen MTT ke setiap sumuran, termasuk kontrol media (tanpa sel). Setelah diinkubasi 4 jam, ditambahkan 100 µL SDS 10% untuk menghentikan reaksi antara sel hidup dan diinkubasi *over night* (24 jam) pada suhu kamar di tempat gelap. Pada akhir inkubasi serapan dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 570 nm¹².

Data absorbansi masing-masing sumuran, kemudian dikonversikan dalam persen viabilitas sel dengan menggunakan persamaan :

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{a-b}{c-b} \times 100\%$$

Keterangan :

a = absorbansi sel perlakuan;

b = absorbansi kontrol medium;

c = absorbansi sel kontrol.

Nilai IC_{50} dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linear yang menggambarkan hubungan antara persentase (%) viabilitas sel T47D dan sel Vero dengan log konsentrasi sampel uji:

$$Y = a + bx$$

Keterangan :

x = log konsentrasi senyawa;

y = persen viabilitas sel;

IC_{50} = anti log x

Indeks selektivitas diperoleh dari nilai IC_{50} sel Vero dibandingkan dengan nilai IC_{50} sel kanker payudara. Ekstrak dikatakan mempunyai selektivitas yang tinggi apabila nilai *Index Selectivity* (SI) ≥ 3 , dan dikatakan kurang selektif apabila nilai $SI \leq 3$ ¹³. Selektivitas ditentukan dengan menggunakan parameter SI dengan rumus :

$$SI = \frac{IC_{50} \text{ pada Sel Vero}}{IC_{50} \text{ pada Sel T47D}}$$

Uji Imunositokimia

Sel T47D dengan kepadatan 5×10^4 sel/sumuran ditanam pada *cover slips* (Nunc) dalam 24-well plate (Nunc) sampai 80% konfluen. Setelah itu, plate tersebut diberi perlakuan kontrol tanpa antibodi (3 well), kontrol sel dengan antibody p53 dan Bcl-2 (6 well), kontrol positif

(doksorubisin) (3 well) dan kontrol senyawa uji (12 well) masing-masing $3 \times$ replikasi dengan variasi IC_{50} lalu diinkubasi dalam inkubator pada suhu $37^{\circ}C$ selama 24 jam. Selanjutnya, medium diambil dan plate yang berisi sel dicuci dengan PBS. Sel difiksasi dengan metanol dingin selama 10 menit pada suhu $4^{\circ}C$ kemudian dicuci dengan PBS. Selanjutnya sel diberi larutan hidrogen peroksida (*blocking solution*) pada suhu ruang. Sel kemudian dicuci kembali dengan PBS dan diinduksi dengan *prediluted blocking serum* (*Background Sniper*). Sel dicat dengan antibodi primer Bcl-2 dan p53, dicuci kemudian ditambahkan dengan antibodi sekunder dan dicuci kembali dengan PBS. Setelah itu, tambahkan larutan substrat kromogen 3,3-diaminobenzidine (DAB) dan diinkubasi. Reagen DAB dibuang lalu dicuci dengan akuades. Selanjutnya larutan *haematoxylin* ditambahkan ke dalam sumuran lalu diinkubasi selama 10 menit dan selanjutnya dibuang dan dicuci dengan akuades. Sel yang telah diinkubasi kemudian dipanen dan dibuat apusan pada gelas objek. Ekspresi protein dapat diamati dengan mikroskop cahaya. Sel yang mengekspresikan protein p53 dan Bcl-2 akan memberikan warna coklat/gelap, sedangkan yang tidak mengekspresikan protein p53 dan Bcl-2 akan memberikan warna ungu/biru¹⁴.

Analisa Data

Adanya protein p53 dan Bcl-2 dihitung secara kuantitatif menggunakan aplikasi *software image J* versi Java 1.8.0_40 (64-bit) dengan pengamatan 1 lapang pandang $3 \times$ replikasi dan uji statistik menggunakan aplikasi SPSS 21.

Data nilai IC_{50} tiap perlakuan dan data kuantitatif ekspresi gen p53 dan Bcl-2 antara dosis pemberian ekstrak dan fraksi tumbuhan kelakai, kemudian diuji normalitas dengan menggunakan uji *Sapiro Wilk*, jika data terdistribusi normal $P > 0,05$ maka dilanjutkan dengan uji homogenitas untuk melihat apakah data yang diperoleh memiliki varian yang sama atau tidak. Jika terdistribusi normal, maka dilanjutkan uji parametrik menggunakan uji *One Way ANOVA*, jika terdistribusi normal $P < 0,05$ maka terdapat perbedaan sehingga dilanjutkan uji *Post Hoc Test*.

Hasil

Pembuatan serbuk dan ekstrak herba kelakai

Ekstrak etanol herba kelakai menghasilkan rendemen 5,3%. Fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air berturut-turut menghasilkan rendemen 61,68%, 7,29%, dan 20,49%.

Standarisasi ekstrak

Kadar air serbuk dan ekstrak herba kelakai yang diperoleh berturut-turut sebesar 5,8% dan 21,3%. Susut pengeringan serbuk sebesar 6,6%. Bobot jenis ekstrak herba kelakai sebesar 0,82 g/mL.

Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak etanol herba kelakai secara kualitatif menunjukkan hasil positif senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, dan tanin (Tabel 1).

Identifikasi senyawa dilakukan dengan metode KLT hasil yang didapatkan dari penggolongan senyawa yaitu ekstrak dan fraksi herba kelakai mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, triterpenoid/steroid, tanin, dan saponin.

Fraksi n-heksan mengandung senyawa golongan alkaloid, tanin, dan steroid, sedangkan fraksi etil asetat mengandung senyawa golongan flavonoid dan fraksi air mengandung senyawa golongan saponin (Gambar 1).

Uji aktivitas sitotoksik

Hasil uji sitotoksik diperoleh dari pembacaan absorbansi pada *ELISA reader* (Gambar 2). Sel yang hidup akan mempunyai absorbansi yang tinggi karena adanya pembentukan kristal formazan yang berwarna ungu sehingga % hidup akan tinggi¹⁵.

Hasil nilai indeks selektivitas antara sel kanker payudara T47D dan sel Vero didapatkan hasil ekstrak sebesar 10,312, fraksi n-heksan sebesar 24,130; fraksi etil asetat sebesar 7,152; dan fraksi air sebesar 168,030. Ekstrak atau fraksi dikatakan mempunyai selektivitas yang tinggi apabila nilai $SI \geq 3$, dan dikatakan kurang selektif apabila nilai $SI \leq 3$ ¹³.

Hasil uji sitotoksik pada Gambar 3 menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak dan fraksi-fraksi maka nilai viabilitas sel semakin rendah atau semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka sel yang hidup semakin sedikit sehingga semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka akan semakin tinggi efek sitotoksiknya terhadap sel kultur yang diuji. Grafik hubungan pada kelompok perlakuan ekstrak, fraksi n-heksan dan etil asetat menunjukkan terjadinya penurunan persentasi viabilitas sel pada konsentrasi tinggi.

Hasil nilai IC_{50} terkecil pada perlakuan fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat dengan nilai IC_{50} sebesar 86,996 $\mu\text{g/mL}$ dan 98,431 $\mu\text{g/mL}$. Suatu ekstrak

dianggap aktif jika memiliki nilai $IC_{50} \leq 100 \mu\text{g/mL}$ ¹⁶. Hasil IC_{50} ekstrak herba kelakai sebesar $126,0715 \mu\text{g/mL}$ yang termasuk sebagai antikanker dengan klasifikasi *moderate* dengan nilai IC_{50} 100-500 $\mu\text{g/mL}$ yang masih dapat dikembangkan sebagai antikanker. Sedangkan hasil dari fraksi air dianggap tidak aktif karena nilai $IC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$ ¹⁷.

Uji Imunositokimia

Hasil pemeriksaan imunositokimia menunjukkan adanya peningkatan ekspresi p53 pada sel kanker T47D setelah perlakuan dengan ekstrak dan fraksi n-heksan dibandingkan dengan tanpa perlakuan (Gambar 4). Ekspresi p53 semakin meningkat dengan meningkatnya konsentrasi sampel yang terdeteksi berupa warna coklat pada sitoplasma sel T47D.

Hasil analisis melalui *image J* dari rerata lapang pandang menunjukkan bahwa ekspresi p53 tanpa perlakuan 9,842%. Sedangkan ekspresi p53 konsentrasi ekstrak 63,035 $\mu\text{g/mL}$ dan fraksi n-heksan 43,498 $\mu\text{g/mL}$ menunjukkan hasil berturut-

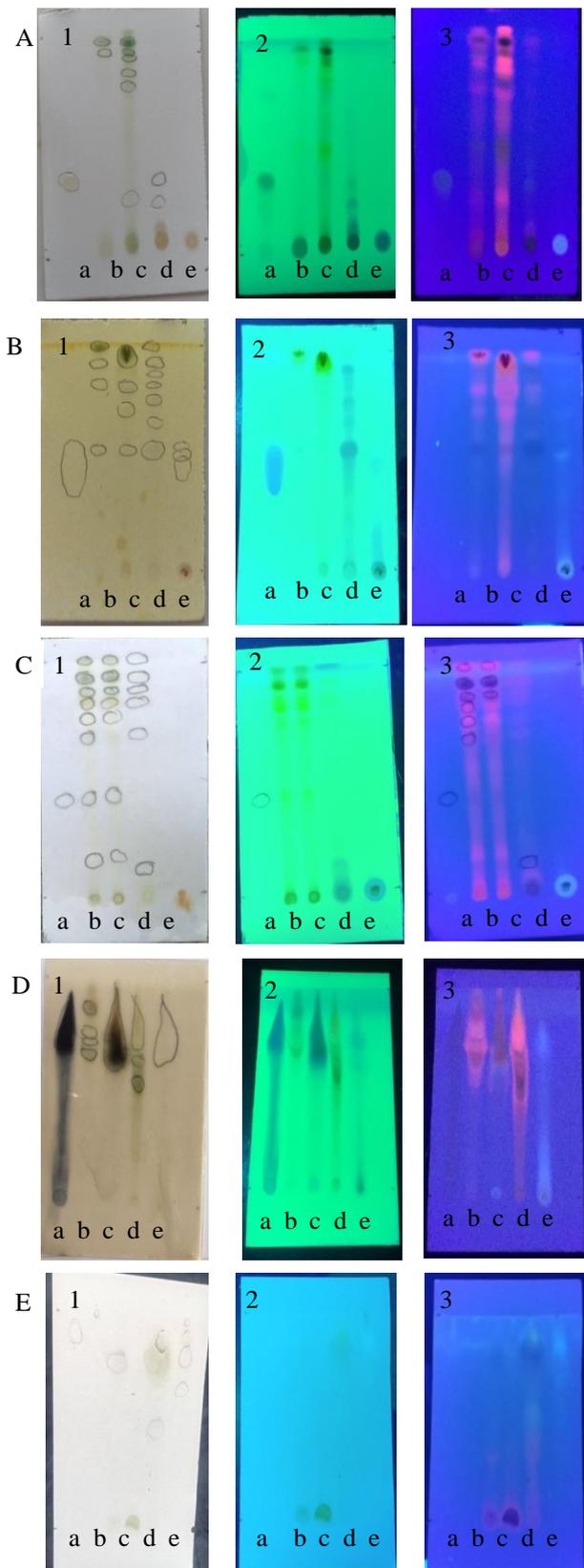
turut 10,231% dan 16,393% yang berarti adanya peningkatan ekspresi p53 antara kelompok perlakuan ekstrak, fraksi n-heksan dibandingkan dengan kelompok negatif (Tabel 2).

Hasil pemeriksaan ekspresi Bcl-2 menunjukkan adanya penurunan ekspresi protein Bcl-2 pada sel T47D setelah perlakuan ekstrak dan fraksi n-heksan dibandingkan dengan kontrol negatif (Gambar 5). Ekspresi Bcl-2 ditunjukkan dengan adanya ikatan antara protein Bcl-2 dengan antibodi monoklonal anti Bcl-2 yang terdeteksi berupa warna coklat pada sitoplasma dan membran sel T47D. Ekspresi Bcl-2 semakin menurun dengan semakin meningkatnya konsentrasi sampel.

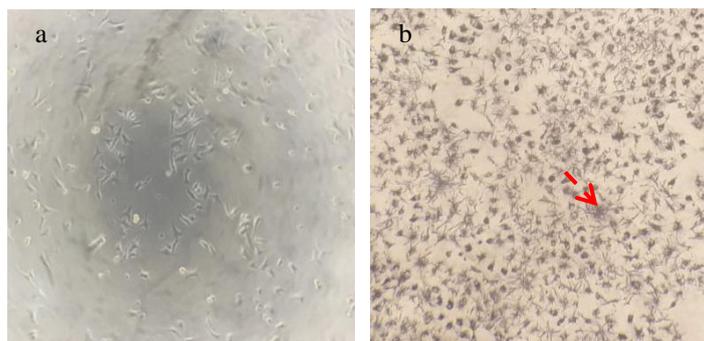
Hasil menunjukkan bahwa ekspresi Bcl-2 pada sel tanpa perlakuan sebesar 13,024% dari area lapang pandang, sedangkan ekspresi Bcl-2 dengan ekstrak dan fraksi dengan konsentrasi 63,035 $\mu\text{g/mL}$ dan 43,498 $\mu\text{g/mL}$ berturut-turut sebesar 9,119% dan 9,299%. Hasil ini menggambarkan adanya penurunan ekspresi Bcl-2 setelah perlakuan sampel.

Tabel 1. Hasil Identifikasi Kandungan Senyawa Serbuk dan Ekstrak Herba Kelakai

Senyawa	Keterangan
Flavonoid	+
Alkaloid	+
Saponin	+
Triterpenoid/steroid	-
Tanin	+

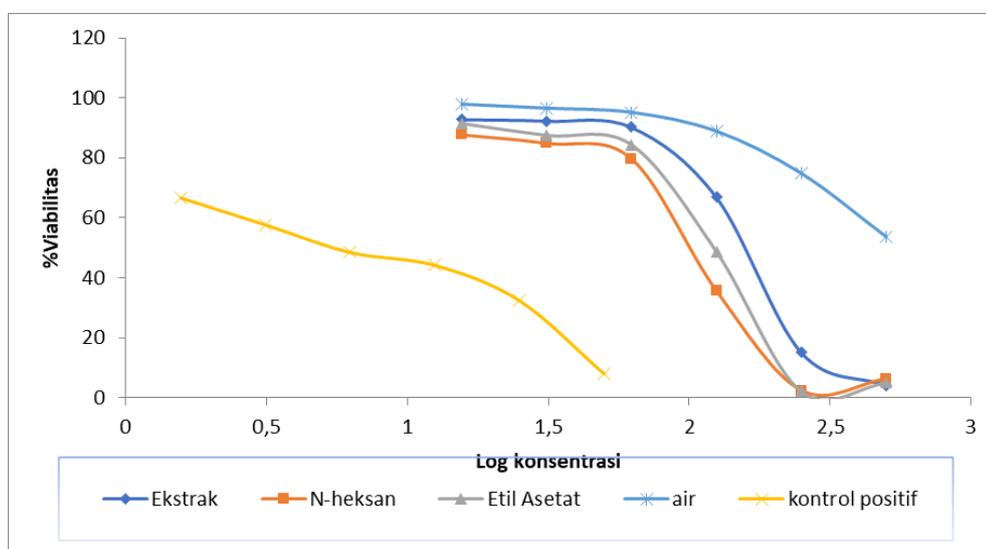


Gambar 1. Profil KLT. Keterangan: A. Flavonoid; B. Alkaloid; C. triterpen/steroid; D. Tanin asam galat; E. Saponin; 1. Sinar tampak; 2. Sinar UV 254 nm; 3. Sinar UV 366 nm; a. Baku; b. Ekstrak; c. Fraksi n-heksan; d. Fraksi etil asetat; e. Fraksi air



Gambar 2. Morfologi Sel T47D.

Keterangan: a. sebelum perlakuan MTT; b. setelah perlakuan MTT (tanda panah menunjukkan kristal formazan)



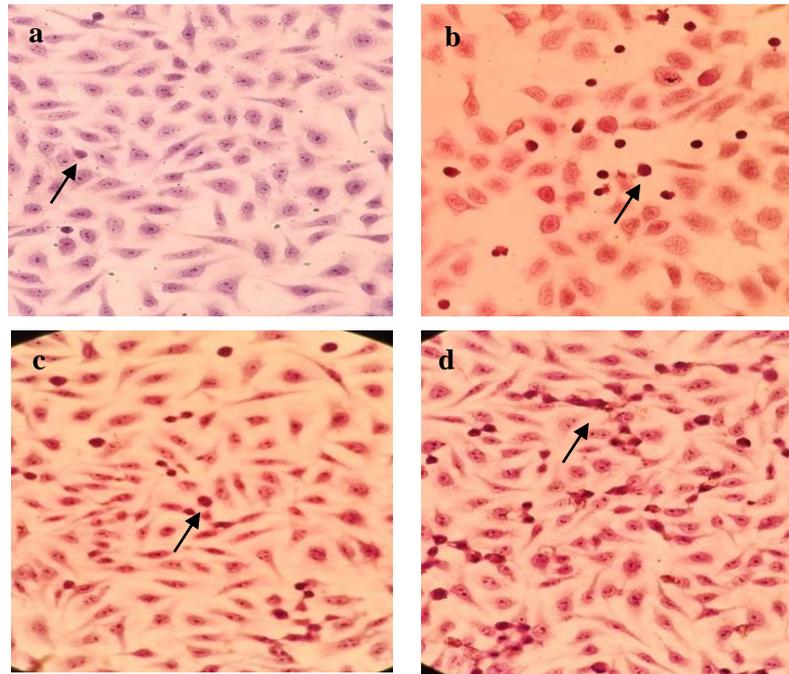
Gambar 3. Hubungan Persentase Viabilitas Sel T47D terhadap Log Konsentrasi Sampel dan Kontrol Positif Dokсорubisin

Pembahasan Standarisasi ekstrak

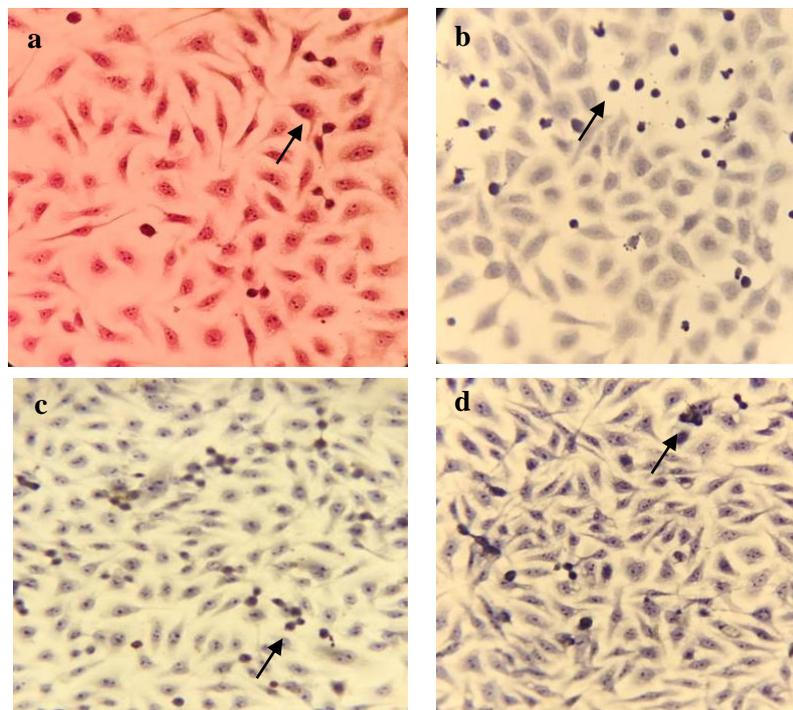
Penetapan kadar air dari serbuk dan ekstrak herba kelakai memenuhi syarat yaitu kurang dari 5-30%, sehingga dapat meningkatkan mutu serbuk dan ekstrak herba kelakai. Jika kadar air kurang dari 30%, hal ini dapat menghentikan reaksi enzimatis dan pertumbuhan jamur.¹¹ Susut pengeringan serbuk kurang dari 10%, dimana hasil susut pengeringan identik dengan kadar air. Hasil bobot jenis berbeda dengan hasil yang dilakukan oleh

Suryadini¹⁸, hal ini disebabkan karena pelarut yang digunakan berbeda.

Ekstrak yang diperoleh selanjutnya diidentifikasi kandungan senyawanya. Berdasarkan pengujian kualitatif, kandungan kimia serbuk dan ekstrak herba kelakai dari Kota Palangkaraya mengandung flavonoid, alkaloid, saponin, dan tanin. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian lainnya yang menyebutkan bahwa herba kelakai memiliki kandungan senyawa flavonoid, tanin, dan alkaloid^{19,20}.



Gambar 4. Ekspresi protein p53. Keterangan: a. kelompok sel T47D p53; b. kontrol positif (doksorubisin); c. kelompok ekstrak 63,035 µg/mL; d. kelompok n-heksan 43,498 µg/mL (perbesaran 400x). *tanda panah (→) menunjukkan area ekspresi protein p53 warna sel coklat/gelap (positif)



Gambar 5. Ekspresi protein Bcl-2. Keterangan: a. kelompok sel T47D Bcl-2; b. kontrol positif (doksorubisin); c. kelompok ekstrak 63,035 µg/mL; d. kelompok n-heksan 43,498 µg/mL (perbesaran 400x). *tanda panah (→) menunjukkan area ekspresi protein Bcl-2 warna sel biru/ungu (negatif)

Tabel 2. Hasil Ekspresi p53 dan Bcl-2

Perlakuan	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata luas area ekspresi p53 (%) \pm SD (n=3)	Rata-rata luas area ekspresi Bcl-2 (%) \pm SD (n=3)
Ekstrak	126,071	14,917 \pm 0,239	5,094 \pm 0,720
	63,035	10,231 \pm 0,465	9,119 \pm 0,599
	31,518	8,057 \pm 0,854	12,906 \pm 1,756
Fraksi n-heksan	86,996	3,41 \pm 1,596	6,791 \pm 0,505
	43,498	16,393 \pm 2,261	9,299 \pm 1,672
	21,747	9,853 \pm 1,249	13,022 \pm 2,35
Kontrol positif (doksorubisin)	5,603	9,853 \pm 1,249	9,865 \pm 1,51
Kontrol negatif	0	9,842 \pm 0,665	13,024 \pm 2,64

Sedangkan pengujian lanjutan menggunakan metode KLT positif menunjukkan adanya senyawa alkaloid pada ekstrak, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air. Steroid dan triterpenoid termasuk dalam senyawa yang bersifat non polar. Isolasi yang dilakukan oleh Chear *et al*⁶ menghasilkan senyawa golongan flavonoid yaitu kaempferol. Berdasarkan pengujian kualitatif dengan metode KLT menunjukkan adanya senyawa flavonoid pada fraksi etil asetat.

Uji sitotoksik

Dari hasil IC_{50} herba kelakai yang memiliki aktivitas sitotoksik terkecil pada perlakuan fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat dengan nilai IC_{50} 86,996 $\mu\text{g/mL}$ dan 98,431 $\mu\text{g/mL}$. Fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat dapat dikatakan memiliki aktivitas antikanker paling aktif karena dengan IC_{50} yang terkecil sudah mampu menghambat 50% pertumbuhan sel T47D. Sedangkan pada pengujian sebelumnya tumbuhan kelakai yang diteliti terhadap sel kanker payudara MCF-7 dan MDA-MB-231 menunjukkan hasil IC_{50} masing-masing 35 μM dan 25 μM ⁶.

Fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat memiliki aktivitas sitotoksik yang paling aktif karena kandungan senyawa yang terdapat pada fraksi n-heksan adalah alkaloid. Mekanisme senyawa alkaloid berperan sebagai tubulin inhibitor. Pada proses siklus sel, alkaloid berikatan dengan tubulin yaitu suatu protein yang menyusun mikrotubulus. Terikatnya tubulin pada senyawa alkaloid mengakibatkan polimerasi protein menjadi mikrotubulus akan terhambat sehingga pembentukan spindle mitotik akan terhambat dan siklus sel akan berhenti pada metafase. Karena tidak dapat melakukan pembelahan sel, sel tersebut kemudian akan mengalami apoptosis. Sedangkan pada fraksi etil asetat menunjukkan adanya senyawa flavonoid. Flavonoid memiliki mekanisme dalam menginduksi apoptosis adalah dengan melalui penghambatan aktivitas DNA topoisomerase I/II, modulasi *signalling pathway*, penurunan ekspresi gen Bcl-2 dan Bcl-XL, peningkatan ekspresi gen Bax dan Bak, serta aktivitas endonuklease²⁰.

Pada kelompok fraksi air berdasarkan hasil uji sitotoksik tidak memberikan efek sitotoksik pada sel kanker payudara T47D. Hal ini

dimungkinkan karena sifat sangat polar dari fraksi air menyebabkan senyawa akan sulit menembus membran sel kanker yang bersifat nonpolar (hidrofobik). Sel kanker terdiri dari membran sel dengan penyusunan berupa P-glikoprotein yang merupakan pelindung sel dan bersifat hidrofobik sehingga obat yang masuk biasanya mengalami *bypassing* atau adanya *efflux* pengeluaran obat.

Mekanisme aksi doksorubisin kemungkinan melibatkan ikatan dengan DNA melalui interkalasi di antara pasangan basa serta menghambat sintesis DNA dan RNA. Kemungkinan mekanisme yang lain adalah melibatkan ikatan lipid membran sel yang akan mengubah berbagai fungsi seluler dan berinteraksi dengan topoisomerase II membentuk kompleks pemotong DNA²¹. Doksorubisin digunakan sebagai kontrol pembanding karena luasnya penggunaan obat ini dalam pengobatan beberapa jenis kanker di Indonesia²².

Uji Imunositokimia

Pengamatan ekspresi protein p53 dan Bcl-2 pada sel T47D yang dilakukan dengan menggunakan analisis imunositokimia terhadap protein p53 dan Bcl-2. Ekstrak dan fraksi n-heksan herba kelakai dapat menginduksi apoptosis pada sel kanker payudara T47D. Sel T47D merupakan sel kanker payudara yang memiliki karakteristik *caspase-3 wildtype*, *caspase-7 wildtype*, Esterogen Reseptor (ER) atau Progesteron Reseptor (PR) positif dan p53 *mutant*²³.

Penelusuran jalur apoptosis pada penelitian ini melalui peningkatan ekspresi protein p53 dan ekspresi protein Bcl-2 yang dapat menurun akibat perlakuan ekstrak dan fraksi n-heksan menyebabkan

aktivasi Puma dan Noxa. Kedua protein ini mengaktifkan protein multidominan Bax dan Bak. Aktivasi Bax dan Bak oleh Puma dan Noxa diatur oleh protein anti apoptosis Bcl-2, Bcl-XL, MCL1. Pada saat ekspresi Bcl-2 menurun ekspresi Bax akan meningkat. Aktivasi Bax menyebabkan pelepasan sitokrom c, *Samc/Diablo*, *Apoptosis Inducing Factor* (AIF), dan *omi/Htr2*. Dengan adanya dATP akan terbentuk kompleks antara sitokrom c, APAF-1 dan *caspase 9* yang disebut apoptosom. Selanjutnya, *caspase 9* akan mengaktifkan *downstream procaspase 3*. Protein *caspase 3* berperan sebagai efektor dalam melaksanakan apoptosis²⁴.

Flavonoid sub golongan flavonol yaitu *quercetin*, selain teridentifikasi menghambat efek enzim sitokrom CYP1A juga meningkatkan kadar p53 yang akibatnya terjadi induksi apoptosis. Selain itu *quercetin* juga menginduksi *conjugation enzyme* fase II sehingga mencegah deplesi *glutathione* tereduksi (GSH) yang diduga kuat sebagai mekanisme potensial mencegah perkembangan tumor²⁵. Isolasi senyawa flavonoid yang dilakukan oleh Chear⁶ menghasilkan beberapa jenis kaempferol. Kaempferol menyebabkan penghambatan siklus sel pada fase G1 dan G2 lewat penghambatan *Cyclin D Kinase* (CDK). Kaempferol juga dapat menurunkan aktivitas dari protein kinase yang dapat membantu fosforilasi Bcl-2, sehingga sel tetap mengalami apoptosis²⁶.

Senyawa saponin yang terdapat dalam herba kelakai merupakan senyawa yang dapat menghambat sel kanker dengan cara menghambat pembentukan Bcl-2 yang diekspresikan terlalu tinggi, menginduksi protein *caspase 3* yang diekspresikan terlalu rendah, meningkatkan ekspresi p53

dan menghambat fase G²⁸. Senyawa tanin berpotensi sebagai antikanker, dengan bekerja pada tingkat sel dengan memblokir fase S atau sintesis dari siklus sel²⁷.

Kesimpulan

Fraksi etil asetat, dan fraksi n-heksan herba kelakai (*Stenochleana palustris*) memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D, ekstrak memiliki efek sitotoksik sedang, sedangkan fraksi air tidak memiliki aktivitas. Indeks selektivitas ekstrak dan fraksi n-heksan herba kelakai yang paling baik terhadap sel kanker payudara T47D dibandingkan dengan sel vero. Ekstrak dan fraksi n-heksan herba kelakai dapat meningkatkan ekspresi p53 dan menurunkan ekspresi protein Bcl-2.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai isolasi pemurnian senyawa yang lebih spesifik di dalam herba kelakai (*Stenochleana palustris*), aktivitas molekuler antikanker herba kelakai (*Stenochleana palustris*) terhadap sel T47D selain aktivitas p53 dan Bcl-2 serta uji *in vivo* pada hewan uji coba terkait aktivitas herba kelakai dalam menghambat pertumbuhan kanker payudara.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terimakasih ditujukan kepada Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi yang telah memfasilitasi penelitian ini dan Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada yang memfasilitasi uji sitotoksik dan imunositokimia. Terimakasih disampaikan juga kepada segala pihak yang terlibat

dalam penelitian ini, kepada Ibu Dr. Titik Sunarni, M.Si., Apt dan Ibu Dr. Opstaria Saptarini, M.Si., Apt selaku pembimbing tesis.

Daftar Rujukan

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. 3
2. Kementerian Kesehatan RI Badan Penelitian dan Pengembangan. Hasil Utama Riset Kesehatan Dasar. In: *Kementerian Kesehatan Republik Indonesia*. ; 2018:1-100.
3. Cristiandari EM. Uji Efek Ekstrak dan Fraksinasi Daun Salung (*Psychotria viridiflora* Reinw, ex. Blume) pada Sel Kanker Payudara T47D. *J Kesehat Palembang*. 2018;12(1):9-20.
4. Saini VK, Sewal RK, Ahmad Y, Medhi B. Prospective Observation Study of Adverse Drug Reactions of Anticancer Drug Used in Cancer Treatment in a Tertiary Care Hospital. 2015;77:687-693.
5. Arullappan S, Sawai S, Chee LA, Mahandan M, Shanmugavelan R. Phytochemical screening and evaluation of cytotoxic effect and antioxidant activity of fractions isolated from *stenochlaena palustri* (Burm.f.) bedd. leaves. *Indian J Pharm Educ Res*. 2017;51(4):S735-S740.
6. Chear NJY, Fauzi AN, Khaw KY, Choi SB, Yaacob NS, Lai CS. Free Radical Scavenging and Cytotoxic Properties of Acylated and Non-Acylated Kaempferol Glycosides from *Stenochlaena Palustris*: a Perspective on Their Structure – Activity Relationships. *Pharm Chem J*. 2019;53(3):188-193.
7. Kim SH, Choi KC. Anti-cancer effect and underlying mechanism(s) of Kaempferol, a phytoestrogen, on the regulation of apoptosis in diverse cancer cell models. *Toxicol Res*. 2013;29(4):229-234.
8. Margono DPNH, Suhartono E, Arwati H. Potensi Ekstrak Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F) Bedd) terhadap Kadar Tumor Necrosis Factor-Alfa (TNF- α) pada Mencit BALB/c yang Diinfeksi *Plasmodium berghei* ANKA. *Berk Kedokt*. 2016;12(1):77.
9. Chai TT, Panirchellvum E, Ong HC, Wong FC. Phenolic contents and antioxidant properties of *Stenochlaena palustris*, an edible medicinal fern. *Bot Stud*. 2012;53(4):439-446.
10. Gunawan D, Mulyani S. *Ilmu Obat Alam*

- (Farmakognosi) Jilid 1. Jakarta: penebar wadaya; 2004.
11. Depkes R. *Cara Pembuatan Simplisia*. Jakarta: Departemen Kesehatan, Republik Indonesia; 1985.
 12. CCRC UGM. Prosedur tetap. *Uji Komb Dengan Agen Kemoterapi*. 2009:6-9.
 13. Sutejo IR, Putri H, Meiyanto E. Selektivitas Ekstrak Etanolik Buah Makassar (Brucea javanica) pada Kanker Payudara Metastasis secara In Vitro. *J Agromedicine Med Sci*. 2016;2(1):1-6.
 14. Apriani R, Gaffar S, Herlina T, Kimia D, Matematika F, Alam P. Cytotoxic Activity of Ethyl Acetate Fraction Moringa oleifera Leaves and Its Effect on Apoptosis Induction Against T47D Breast Cancer Cell Line. 2019.
 15. Putri H. *Prosedur Tetap Uji Sitotoksik Metode MTT*; 2013.
 16. Kamuhabwa A, Nshimo C, De Witte P. Cytotoxicity of some medicinal plant extracts used in Tanzanian traditional medicine. *J Ethnopharmacol*. 2000;70(2):143-149.
 17. Machana S, Weerapreeyakul N, Barusrux S, Nonpunya A, Sripanidkulchai B, Thitimetharoch T. Cytotoxic and apoptotic effects of six herbal plants against the human hepatocarcinoma (HepG2) cell line. *Chin Med*. 2011;6(1):39.
 18. Suryadini H. UJI PARAMETER STANDARD DAN PENAPISAN FITOKIMIA PADA DAUN STERIL KALAKAI (*Stenochlaena palustris* (Burm.f.) Bedd.) MENGGUNAKAN EKSTRAKSI BERTINGKAT. *J Ilm Farm Farmasyifa*. 2019;2(1):40-51.
 19. Ho R, Teai T, Lafont R, Raharivelomanana P. Ferns : From Traditional Uses to Pharmaceutical Development , Chemical Chapter 23 Ferns : From Traditional Uses to Pharmaceutical Development , Chemical Identification of Active Principles. 2010;(October).
 20. Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. Flavonoids: Promising anticancer agents. *Med Res Rev*. 2003;23(4):519-534.
 21. Yang F, Teves SS, Kemp CJ, Henikoff S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2014;1845(1):84-89.
 22. Herdwiani W, Rejeki ES. uji aktivitas sitotoksik ekstrak kulit kayu manis (*Cinnamomum burmannii*) terhadap kulit sel T47D. 2015;12(2):102-113.
 23. MacGregor Schafer J, Lee ES, O'Regan RM, Yao K, Jordan VC. Rapid development of tamoxifen-stimulated mutant p53 breast tumors (T47D) in athymic mice. *Clin Cancer Res*. 2000;6(11):4373-4380.
 24. Sari LM. Apoptosis: Mekanisme Molekuler Kematian Sel. *Cakradonya Dent J*. 2018;10(2):65-70.
 25. Ramos S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol Nutr Food Res*. 2008;52(5):507-526.
 26. Chen YA, Chen YC. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. 2011;46(4):564-574. e
 27. Raju J, Patlolla JMR, Swamy M V., Rao C V. Diosgenin, a steroid saponin of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek), inhibits azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in F344 rats and induces apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13(8):1392-1398.