# Fraksi Etil Asetat Kulit Batang-JFSK 2017-1

*by* Kestrilia .

**Submission date:** 13-Mar-2020 01:41PM (UTC+0800)
**Submission ID:** 1274828291
**File name:** Kestrilia_Fraksi_Etil_Asetat_Kulit_Batang-JFSK_2017-1.pdf (487.28K)
**Word count:** 4808
**Character count:** 28622

JURNAL FARMASI SAINS DAN KOMUNITAS, Mei 2017, hlm. 1-14 Vol. 14 No. 1
p-ISSN: 1693-5683; e-ISSN: 2527-7146
doi: http://dx.doi.org/10.24071/jpsc.141557

# FRAKSI ETIL ASETAT KULIT BATANG FALOAK (*Sterculia quadrifida* R.Br ) MENGINDUKSI APOPTOSIS DAN SIKLUS SEL PADA SEL KANKER PAYUDARA T47D

# ETHYL ACETATE FRACTION OF FALOAK (*Sterculia quadrifida* R.Br) BARK INDUCES APOPTOSIS AND CELL CYCLE ON T47D BREAST CANCER CELLS

**Rollando[1*], Kestrilia Rega Prilianti[2]**

[1]Program Studi Farmasi, Fakultas Sains dan Teknologi,
Universitas Ma Chung, Malang, Jawa Timur
[2]Program Studi Teknik Informatika, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Ma Chung,
Malang, Jawa Timur

Received November 14, 2016; Accepted January 9, 2017

## *ABSTRACT*

*Faloak (Sterculia quadrifida R.Br) is one source of bioactive compounds that could be developed as chemotherapeutic agent. Empirically East Nusa Tenggara people use boiled water of faloak bark as a cure for hepatitis (types A, B, and C), and gastroenteritis. This study was performed to test anticancer activity fraction of n-hexane, ethyl acetate, ethanol, and methanol of ethanolic extract from faloak stem bark for the type of breast cancer cell line T47D, and normal cell types Vero using cytotoxic 3- (4,5-dimetilazol- 2-yl) -2,5-difeniltetrazolium bromide (MTT) test method. Ethanolic extract was subjected to column chromatography using different solvents polarity level as n-hexane, ethyl acetate, ethanol, and methanol. Testing the cytotoxic effects using the MTT assay in T47D breast cancer cells and normal Vero cells with $EC_{50}$ parameter. Ethyl acetate fraction in inducing apoptosis and cell cycle modulation was observed with flowcytometry method. The test results cytotoxic fraction indicating the fraction of ethyl acetate has the lowest activity with $EC_{50}$ of 24.88 µg/mL and selectivity index of 15.58. Ethyl acetate fraction effects an accumulation of cells in S phase (27.43%) in breast cancer cells T47D which is able to induce apoptosis. These results demonstrate that the ethyl acetate fraction can be developed as a chemotherapeutic agent in improving the effectiveness of breast cancer treatment.*

***Keywords:*** *apoptotic, breast cancer, cell cycle, cytotoxicity, faloak*

## ABSTRAK

Faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) merupakan salah satu sumber senyawa bioaktif yang dapat dikembangkan sebagai agen obat. Secara empiris masyarakat Nusa Tenggara Timur menggunakan air rebusan kulit batang tumbuhan faloak sebagai penyembuhan penyakit hepatitis (jenis A, B, dan C), gastroentritis, dan penambah stamina. Penelitian ini dilakukan untuk menguji aktivitas antikanker terhadap sel kanker payudara jenis T47D dan sel normal jenis Vero dengan metode uji sitotoksik 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida (MTT). Ekstrak etanol yang diperoleh difraksinasi menggunakan metode kromatografi kolom dengan menggunakan pelarut yang berbeda tingkat polaritasnya seperti n-heksana, dietil eter, dan etil asetat. Uji efek sitotoksik menggunakan metode MTT pada sel

*Corresponding author: Rollando
Email: *rollando@machung.ac.id*

kanker payudara T47D dan sel normal Vero dengan parameter $IC_{50}$. Fraksi etil asetat dalam menginduksi apoptosis dan modulasi siklus sel diamati dengan metode *flow cytometry*. Fraksi hasil tes sitotoksik menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki aktivitas terbesar dengan $IC_{50}$ 24,88 µg/mL dan indeks selektivitas 15,58. Fraksi etil asetat menyebabkan akumulasi sel di fase S (27,43%) pada sel kanker payudara T47D dan mampu menginduksi apoptosis. Hasil ini membuktikan bahwa fraksi etil asetat dari ekstrak etanol kulit kayu faloak dapat dikembangkan sebagai agen kemoterapi dalam meningkatkan efektivitas pengobatan kanker payudara.

**Kata kunci:** apoptosis, kanker payudara, siklus sel, sitotoksisitas, faloak

## PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyebab kematian utama di dunia, yaitu 7,6 juta kematian (sekitar 13% seluruh kematian) pada tahun 2016, dan diperkirakan semakin meningkat hingga mencapai 13,1 juta kematian pada tahun 2030 (WHO, 2016). Kanker payudara menduduki peringkat pertama kasus kanker pada wanita di seluruh dunia, dengan angka kejadian sebesar 1.676.633 dan kanker hati menduduki peringkat tiga dunia dengan angka 879.987 kasus didunia. Kanker payudara merupakan penyebab kematian akibat kanker yang paling banyak pada wanita (IARC, 2015).

Berdasarkan data Riset Kesehatan Dasar 2014, penyakit kanker menjadi penyebab kematian ke-7 di Indonesia (5,7%) setelah stroke, tuberkolosis, hipertensi, cedera, perinatal, dan diabetes mellitus (Kemenkes, 2014). Sedangkan Yayasan Kesehatan Payudara Jakarta menyebutkan bahwa saat ini prevalensi kanker payudara di Indonesia adalah 26 per 100.000 penduduk dengan angka kematian pada urutan kedua setelah kanker leher rahim (Anonim, 2016).

Salah satu permasalahan yang sering timbul dalam pengobatan kanker adalah resistensi obat kemoterapi (*drug resistance*) (Wong et al, 2006). Agen kemoterapi yang sering digunakan dalam terapi kanker payudara adalah cisplatin (Dhar et al, 2011). Cisplatin menimbulkan efek samping antara lain: neurotoksisitas, nefrotoksisitas (Milosavlievic et al, 2010), dan *bone marrow suppression*. Selain itu dilaporkan juga bahwa penggunaan cisplatin menyebabkan terjadinya resistensi. Mekanisme resistensi cisplatin terjadi melalui perubahan pada *uptake* selular, *efflux* obat, penghambatan apoptosis dan peningkatan DNA *repair*. Resistensi sel kanker dan efek samping cisplatin tersebut disebabkan oleh penggunaannya pada dosis tinggi untuk menghasilkan pengobatan yang lebih efektif (Florea and Busselberg, 2011). Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk menemukan obat terhadap penyakit kanker payudara yang bersifat efektif dan selektif.

Salah satu tumbuhan yang digunakan oleh masyarakat secara tradisional sebagai obat multiguna adalah faloak (*Stercuila quadrifida* R.Br). Ramuan kulit batang faloak telah lama dimanfaatkan oleh masyarakat Nusa Tenggara Timur sebagai tanaman obat (Siswandi, 2013). Secara empiris, air rebusan kulit batang tumbuhan faloak digunakan masyarakat Nusa Tenggara Timur sebagai obat hepatitis, tifus, maag, dan pemulihan stamina (Siswandi, 2013; Fabianus, 2012). Siwandi et al. (2013), melalui uji kualitatif golongan senyawa kimia menyatakan bahwa ekstrak aseton, etil asetat, metanol, dan *n*-heksana dari kulit batang tumbuhan faloak memiliki senyawa flavonoid, fenolik dan terpenoid.

Pada penelitian terdahulu diketahui bahwa ekstrak etanol kulit batang faloak (*Stercuila quadrifida* R.Br) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus*

*aureus*, *Salmonela thypi* dan *Canddia albicans* yang menguatkan adanya potensi antibakteri (Rollando, 2016; Fabianus, 2012). Beberapa antibiotik dapat dikembangkan lebih lanjut indikasinya menjadi obat antikanker seperti *doxorubicin* (Tacar et al, 2012), *daunorubicin*, *carminomycin* (Preobrazhenskaya et al, 2006), *bleomycin*, *enediynes*, *mitomycin* (Galm et al, 2005), dan *Kigamicin D* (Masuda et al, 2006). Selain itu fraksi hasil pemisahan dengan metode kromatografi lapis tipis preparatif diteliti mempunyai efek antioksidan yang sangat tinggi dengan $EC_{50}$ setara dengan vitamin C (Rollando, 2016). Secara garis besar, penelitian tentang pembuktian ilmiah dari khasiat kulit batang faloak masih sedikit publikasi dan khasiat kulit batang faloak masih banyak yang belum dieksplorasi. Sehingga dalam penelitian ini dilakukan penelusuran fraksi aktif pada ekstrak etanol kulit batang tumbuhan faloak yang dapat membunuh dan menekan pertumbuhan sel kanker, khususnya pada sel kanker payudara jenis T47D.

## METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk kulit faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) yang diperoleh dari pohon faloak yang tumbuh di kota Kupang Provinsi Nusa Tenggara Timur. Tumbuhan dan kulit batang faloak dideterminasi di Balai Penelitian Lingkungan Hidup dan Kehutanan Kupang dengan nomor herbarium KP.01-1182. Bahan kimia untuk ekstraksi, fitokimia, fraksinasi, kromatografi kolom dan kromatografi lapis tipis antara lain aseton, *n*-heksana, dietil eter, etil asetat, metanol, etanol, air suling, pereaksi Dragendorf, pereaksi Mayer, pereaksi Liebermann-Burchard, $FeCl_3$ dan natrium hidroklorida, lempeng silika gel $GF_{254}$, silika gel 60 F dan *glass wool*.

Sel kanker yang digunakan pada penelitian ini adalah sel kanker yang mengalami cacat pada gen *p53* (T47D) dan sel normal (Vero). Sel tersebut kulturkan dengan media lengkap yakni media kultur DMEM (untuk sel T47D) dan M199 (untuk sel Vero) yang masing-masing berisi FBS 10% (Gibco), penisilin-streptomisin 1% (Gibco), dan fungizon 0,5% (Gibco). Kultur sel ini disimpan di dalam inkubator $CO_2$ untuk panen sel antara lain PBS (*Phosphat Buffer Saline*), tripsin. Pelarut sampel menggunakan DMSO. Bahan untuk uji sitotoksik adalah [3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromide] (MTT) 5 mg/mL dan *reagen stopper* (natrium deosil sulfat, Merck) 10%.

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas, lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, cawan, vial, mikrotube, autoklaf, tabung konikal, *96-wellplate*, *6-well plate*, *tissue culture flask*, *6 cm dish*, *Elisa reader* SLT 340 ATC, *flacon flask*, neraca analitik, sentrifus, inkubator 37 ºC 5% $CO_2$, lemari es, *laminar air flow class II*, tangki nitrogen cair, *hemocytometer*, *object glass*, *deck glass*, mikroskop kontras (olimpus), mikropipet, kamera digital, oven, hammer mill, saringan ukuran 40 dan 60 mesh, eksikator, dan pinggan porselin. Alat yang digunakan untuk ekstraksi dan fraksinasi antara lain bejana maserasi, kertas saring, alat-alat gelas, lemari pendingin, *rotary evaporator*.

### Persiapan Bahan Baku Sebagai Simplisia

Bahan baku penelitian diperoleh dari pohon faloak yang tumbuh di kota Kupang dan sekitarnya. Pohon faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) yang digunakan dalam penelitian ini adalah pohon yang telah berdiameter minimal 30 cm. Kulit pohon faloak yang dikumpulkan selanjutnya dilakukan pemilahan dengan cara memisahkan bahan kulit dari kotoran lain yang melekat atau tercampur. Kulit bagian luar dipisahkan dari kulit bagian dalam untuk dibuang dengan cara dikikis, dan dibilas dengan air bersih. Agar memudahkan proses pengeringan dan penggilingan, kulit pohon yang telah dibersihkan kemudian diiris-iris. Kulit yang

telah diiris-iris, selanjutnya dikering udarakan dalam suhu ruangan. Serbuk kulit berukuran 40 – 60 mesh diperoleh dengan cara digiling dengan *hammer mill*. Ukuran partikel dari simplisia mempengaruhi kecepatan proses ekstraksi dan besarnya rendemen yang dihasilkan. Pengecilan ukuran partikel sampel dimaksudkan untuk memperkecil permukaan sampel sehingga semakin banyak yang terekstraksi. Serbuk sampel yang diperoleh kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 50 °C hingga kadar air kurang dari 10%.

**Ekstraksi Kulit Batang Faloak**

Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Serbuk kulit masing-masing sebanyak ± 2000 gram direndam dalam etanol 96% selama 48 jam dengan mengaduk sesering mungkin. Selanjutnya filtrat etanol 96% dipisahkan dari residunya dengan cara penyaringan. Residu yang diperoleh kemudian direndam lagi dengan etanol 96% selama 24 jam sambil diaduk sesering mungkin. Setelah 24 jam dilakukan penyaringan untuk memperoleh filtrat etanol 96%. Hal ini dilakukan secara berulang-ulang hingga memperoleh filtrat bening. Filtrat diuapkan dengan rotary evaporator pada suhu ±40°C sehingga diperoleh ekstrak pekat kemudian ditimbang berat ekstrak kental etanol 96%.

**Fraksinasi Ekstrak Kental Etanol 96%**

Ekstrak pekat etanol 96% tersebut difraksinasi dengan *n*-heksana, dietil eter dan etil asetat dengan menggunakan kromatografi kolom. 200 mg ekstrak kental etanol 96% dilarutkan dengan 50 mL etanol 96%, kemudian dimasukan kedalam kolom kromatografi yang telah diisi dengan silika. Dimasukkan ke dalam kolom 200 mL *n*-heksana, ditunggu hingga cairan *n*-heksana yang membawa senyawa kimia keluar dari ujung kolom kromatografi, cairan yang keluar ditampung kedalam botol. Penampungan cairan *n*-heksana dihentikan ketika cairan *n*-heksana yang keluar dari kolom sudah terlihat bening. Fraksinasi menggunakan dietil eter dan etil asetat juga dilakukan dengan cara yang sama seperti fraksinasi menggunakan n-heksan. Fraksi *n*-heksana, dietil eter, dan etil asetat diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu ± 40 °C untuk memperoleh ekstrak n-heksan, dietil eter, dan etil asetat pekat. Semua fraksi pekat n-heksan, dietil eter, etil asetat, dan residu pekat hasil fraksinasi dikeringkan dalam oven pada suhu ± 50 °C. Masing-masing ekstrak ditimbang untuk mengetahui rendemennya sebagai persentase zat ekstraktif (% zat ekstraktif).

**Uji Sitotoksik Fraksi terhadap Sel T47D dan Sel Vero**

Sel dalam kondisi 80% konfluen untuk dipanen diambil dari inkubator $CO_2$. Jumlah sel dihitung dan dibuat pengenceran sel dengan medium komplit. Sel dengan kepadatan $10^4$ sel/sumuran ditransfer ke dalam sumuran, masing-masing 100 µl. Setiap kali mengisi 12 sumuran, sel diresuspensi agar tetap homogen. Keadaan sel diamati dengan mikroskop *inverted* untuk melihat distribusi sel. Sel diinkubasi dalam inkubator $CO_2$ selama semalam (agar sel pulih kembali setelah panen). Perlakuan sel dengan sampel dilakukan setelah sel kembali dalam keadaan normal. Setelah sel normal kembali, dibuat seri konsentrasi sampel untuk perlakuan (termasuk kontrol sel dan kontrol media). *Plate* yang telah berisi sel, diambil dari inkubator $CO_2$, kemudian media sel dibuang. Seri konsentrasi sampel (500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,75, 7,8 µg/mL) dimasukkan ke dalam sumuran (*triplo*) dan diinkubasi di dalam inkubator $CO_2$. Larutan uji kontrol positif cisplatin dibuat dengan pengenceran menggunakan media kultur pada konsentrasi 1, 2, 5, 10, 15, 30, 50 µM. Lama inkubasi adalah 24 jam (terlihat adanya efek sitotoksik). Reagen MTT disiapkan untuk perlakuan (0,5 mg/mL) dengan cara mengambil 1,0 mL stok MTT dalam PBS (5 mg/mL), diencerkan dengan medium komplit sampai 10,0 mL. Media sel dibuang lalu ditambahkan 100 µl reagen MTT ke setiap sumuran. Sel diinkubasi

selama 4 jam di dalam inkubator $CO_2$ dilakukan sampai terbentuk formazan. Kondisi sel diperiksa dengan mikroskop *inverted*. Jika formazan telah jelas terbentuk, ditambahkan *reagen stopper* 100 µl SDS 10% dalam HCl 0,1 N. *Plate* dibungkus alumunium foil dan diinkubasi di tempat gelap pada temperatur kamar selama semalam. Absorbansi masing-masing sumuran dibaca dengan *plate reader* pada panjang gelombang 595 nm.

**Identifikasi Fraksi Aktif Antikanker**

Lima mg fraksi aktif hasil uji sitotoksik dilarutkan dalam kloroform: metanol (1:1), ditotolkan pada plat alumunium silika gel $GF_{254}$ dan dielusi dengan fase n-propanol:air:asam asetat glasial (5:1:1) . Jarak pengembangan 8 cm. Jumlah titik penotolan disesuaikan dengan jumlah pereaksi semprot (7 pereaksi semprot), dengan jarak antar penotolan 1 cm. *Chamber* diisi dengan fase gerak kemudian ditunggu sampai jenuh. Plat yang telah ditotolkan larutan uji (10 µL larutan induk 1 mg/mL) dimasukkan dalam *chamber* dan ditunggu sampai proses elusi selesai. Setelah itu, plat dikering-anginkan dan diamati nilai hRf bercak yang terelusi dibawah sinar UV 254 dan 365 nm. Karakterisasi golongan senyawa dalam fraksi dilakukan dengan pengamatan di bawah sinar tampak, sinar UV 254 nm, UV 365 nm dan visualisasi dengan beberapa pereaksi semprot. Pereaksi semprot yang digunakan antara lain: dragendorff, $FeCl_3$, 2,4-DNPH, vanilin-asam sulfat, anisaldehid-asam sulfat, dan serium sulfat. Setelah perlakuan dengan pereaksi semprot, dilakukan pengamatan sebagai berikut: 1) Pereaksi serium sulfat: setelah disemprot, plat dipanaskan dan diamati di bawah sinar tampak; 2) Pereaksi anisaldehid-asam sulfat, vanilin-asam sulfat dan 2,4-DNPH: setelah disemprot, plat dipanaskan pada suhu 105 °C selama 5 menit, diamati dibawah sinar tampak; 3) Pereaksi dragendorff dan $FeCl_3$: setelah disemprot plat diamati di bawah sinar tampak tanpa pemanasan (Wagner and Bladt, 1996).

**Analisis Data**

**Analisis nilai $EC_{50}$ Uji Sitotoksik**

Data absorbansi yang diperoleh dari uji sitotoksik dikonversikan ke dalam bentuk persentase viabilitas sel yang dihitung menggunakan rumus:

$$\%\ sel\ hidup = \frac{(absorbansi\ perlakuan - absorbansi\ media)}{(absorbansi\ kontrol\ sel - absorbansi\ media)} x\ 100\%$$

Data yang berupa viabilitas sel kemudian dianalisis dengan program *Microsoft Excell 2007* untuk mendapatkan linearitas (r) antara log konsentrasi versus persentase sel yang viabel, serta untuk menghitung nilai $EC_{50}$.

**Analisis nilai $EC_{50}$ Uji Sitotoksik**

Nilai $EC_{50}$ masing-masing sampel yang diperoleh dari perlakuan sampel terhadap sel T47D dan sel Vero ditentukan nilai SI (*Selectivity Index*) yang dihitung menggunakan rumus:

$$Selectivity\ Index\ (SI) = \frac{IC50\ perlakuan\ sampel\ terhadap\ sel\ Vero}{IC50\ perlakuan\ sampel\ terhadap\ sel\ T47D} x\ 100\%$$

Menurut Prayong (2008), suatu senyawa dikatakan selektif membunuh sel kanker payudara T47D dibandingkan dengan sel normal Vero apabila memiliki nilai SI > 3.

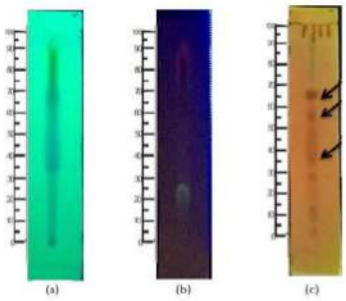
**Analisis Siklus Sel**

Data *flowcytometry* dianalisis dengan program *flowing*. Untuk melihat distribusi presentase sel pada tiap fase G1, S dan G2/M. Penghambatan siklus sel dapat diketahui dengan membandingkan efek perlakuan larutan uji dengan kontrol sel.

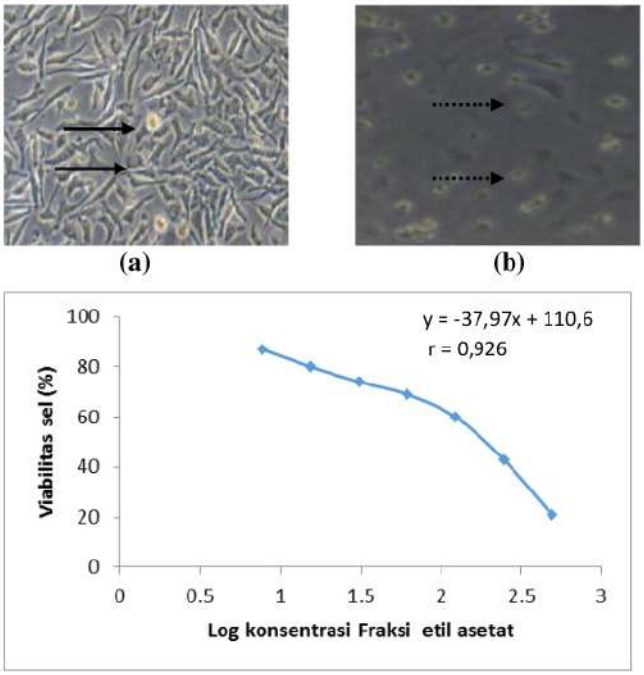
**Analisis Apoptosis**

Data *flowcytometry* menunjukkan persentase sel yang terdapat dalam 4 kuadran, yaitu LL (*lower left*), LR (*lower right*), UL (*upper left*), dan UR (*upper right*). Kuadran LL menunjukkan persen sel yang hidup, kuadran LR menunjukkan persen sel yang mengalami *early* apoptosis, kuadran UL menujukkan persen sel yang

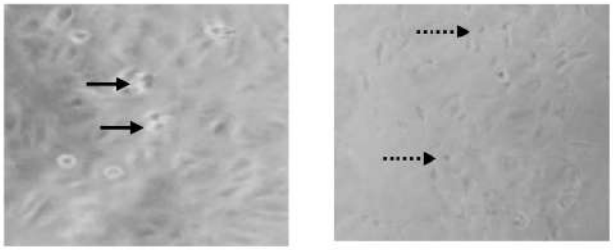
mengalami nekrosis, kuadran UR menujukkan persen sel yang mengalami *late* apoptosis. Induksi apoptosis diketahui dengan membandingkan efek perlakuan senyawa tunggal dan kombinasi dengan kontrol sel.



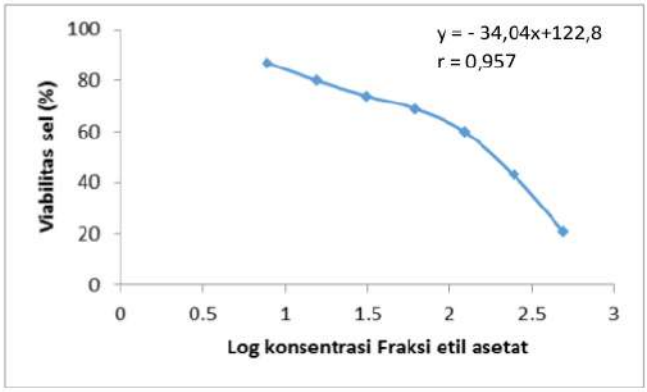

**Gambar 1.** Profil KLT ekstrak etanolik kulitbatang Faloak deteksi senyawa alkaloid. Elusi dilakukan dengan fase diam silika gel 60 F 254 dan fase gerak campuran Propanol:kloroform: asam asetat glasial (5:1:1). Deteksi dilakukan pada sinar UV 254 sebelum disemprot dengan Dragendroff (a), UV 366 sebelum disemprot dengan Dragendroff (b) dan visibel setelah disemprot Dragendroff (c).




**Gambar 2.**Efek perlakuan fraksi etil asetat terhadap sel T47D. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop *inverted* dengan pembesaran 100x. (a) sel tanpa pelakuan; (b) Fraksi etil asetat dengan konsentrasi 25 µg/mL; Morfologi sel T47D yang hidup ditunjukkan dengan gambar panah ( ⟶ ) dan sel yang mengalami perubahan morfologi ditunjukkan dengan tanda panah putus ( - -► ).



(a) (b)




**Gambar 3.** Efek perlakuan fraksi etil asetat terhadap sel Vero. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop *inverted* dengan pembesaran 100x. (a) sel tanpa pelakuan; (b) Fraksi etil asetat dengan konsentrasi 250 µg/ml. Perubahan morfologi sel Vero ditunjukkan dengan gambar panah ( ⟶ ) dan sel yang mengalami perubahan morfologi ditunjukkan dengan tanda panah putus ( - - ► ).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pemeriksaan Ekstrak Etanolik Kulit Batang Faloak

Senyawa alkaloid pada ekstrak etanolik kulit batang faloak setelah dielusi tidak memperlihatkan adanya bercak pada fase diam apabila dilihat secara visibel, begitu pula pada UV 254 maupun 366 nm (Gambar 1a-b), sehingga perlu adanya pendeteksi warna menggunakan pereaksi Dragendroff. Dragendroff (BI3KI) merupakan pereaksi yang umum digunakan dalam mengidentifikasi alkaloid di mana logam berat pada Dragendroff akan berikatan dengan *lone pair electron* pada atom N dari alkaloid (Harborne, 1987). Penampakan bercak menunjukkan positif alkaloid apabila bercak berwarna jingga-kecoklatan setelah disemprot dengan pereaksi Dragendroff (Depkes, 1985). Bercak pada lempeng KLT terlihat warna orange kecoklatan setelah disemprot dengan pereaksi Dragendroff dan menunjukkan nilai hRf 66, hRf 55 dan hRf 35 (Gambar 1c).

### Uji Sitotoksik Fraksi pada sel kanker T47D dan Sel Normal Vero

Data pada Tabel 1 menunjukan parameter nilai $EC_{50}$, bahwa fraksi etil asetat mempunyai aktivitas sitotoksik lebih besar dari pada fraksi *n*-heksana, metanol, dan etanol terhadap sel T47D. Nilai $EC_{50}$ yang didapatkan pada perlakuan fraksi etil asetat menunjukan bahwa dapat dikembangkan sebagai sebagai agen kemopreventif karena didapatkan nilai $EC_{50}$

yang lebih kecil dari 100 µg/mL (Tanaka et al, 1999).

Nilai selektivitas suatu senyawa bertujuan untuk mengetahui tingkat keamanan suatu senyawa antikanker terhadap sel normal. Nilai *selectivity index* yang disyaratkan adalah > 3, yang menandakan bahwa ekstrak atau fraksi mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker tapi dengan pengaruh minimal pada sel normal, dan dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai agen kemopreventif (Prayong et al, 2008). Fraksi etil asetat lebih selektif membunuh sel kanker payudara T47D dibandingkan fraksi lainya Hal tersebut terlihat dari nilai *Selectivity index* fraksi faksi etil asetat dengan nilai > 3. Kuatnya aktivitas antikanker dikatagorikan sebagai berikut: $EC_{50}$ = 5 µg/mL (sangat aktif); $EC_{50}$ = 5-10 µg/mL (aktif); $EC_{50}$= 11-30 µg/mL (sedang); $EC_{50}$ = 30 µg/mL (tidak aktif) (Chou et al, 1998).

Fraksi etil asetat memiliki nilai $EC_{50}$ yang paling kecil daripada fraksi lain, yang menunjukan bahwa fraksi etil asetat merupakan fraksi yang lebih poten daripada fraksi lain terhadap sel T47D dan termasuk dalam fraksi dengan aktivitas antikanker kategori sedang. Profil morfologi sel akibat perlakukan fraksi etil asetat diamati. Perlakuan fraksi etil asetat menyebabkan sel T47D mengalami perubahan morfologi yaitu inti sel tampak mengerut, terlihat sel yang mengalami kematian, dan jumlah sel berkurang, sedangkan sel tanpa perlakuan menunjukkan morfologi yang normal (Gambar 2b).

Efek sitotoksis fraksi etil asetat terhadap sel Vero berdasarkan nilai $EC_{50}$ dan profil morfologi sel menunjukkan efek yang lebih rendah jika dibandingkan dengan efeknya terhadap sel T47D. Perlakuan fraksi etil asetat juga menyebabkan sel Vero mengalami perubahan morfologi, yaitu sel mengecil dan membulat namun diperlukan konsentrasi yang lebih tinggi untuk menghasilkan efek yang sama terhadap sel T47D, sedangkan sel tanpa perlakuan menunjukkan morfologi yang normal (Gambar 3b). Fraksi etil asetat mempunyai efek sitotoksisitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan fraksi lainnya dan mempunyai selektivitas yang baik terhadap sel normal Vero, oleh sebab itu dalam uji efek fraksi terhadap siklus sel dan apoptosis (kematian sel terprogram) di fokuskan pada fraksi etil asetat.

**Uji Siklus Sel Fraksi Etil Asetat**

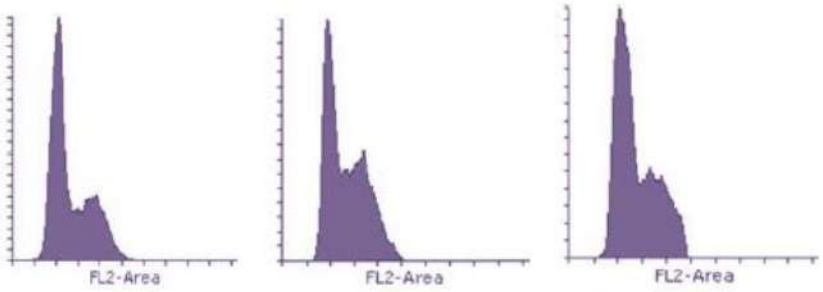
Proses sintesis DNA pada sel kanker melalui siklus sel begitu pula yang terjadi pada sel normal. Salah satu target utama dalam menghambat proliferasi sel kanker adalah modulasi siklus sel yang dapat diamati menggunakan metode *flow cytometry*. *Flow cytometry* mampu mendeteksi tiap fase dalam daur sel berdasarkan jumlah kromosom pada tiap fasenya (G1, S, dan G2/M). Fase G1 memiliki 2n (diploid) kromosom, fase S mengalami replikasi untuk persiapan memasuki fase G2 sehingga jumlah set kromosom antara 2n dan 4n, fase G2 dan membentuk 4n (2 sel diploid) kromosom. *Propidium iodida* digunakan untuk mewarnai tiap fasenya karena mampu berinteraksi dengan DNA (Ross et al, 2003). Pengamatan profil siklus sel dilakukan pada jam ke-24. Analisis *flow cytometry* menggunakan program flowing disajikan pada Gambar 4 dan persentase distribusi siklus sel secara rinci terlihat pada Tabel 2. Kontrol sel mengalami distribusi sel di fase G1, S dan G2/M. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada Cisplatin menyebabkan akumulasi di fase S. Fraksi etil asetat menyebabkan akumulasi sel pada fase S apabila dibandingkan dengan kontrol sel. Pada perlakuan fraksi etil asetat persentase distribusi siklus sel pada fase S sebesar 27,43% lebih besar dibandingkan dengan cisplatin tunggal sebesar 13,12%. Akumulasi sel pada fase S fraksi etil asetat mengalami peningkatan dibandingkan dengan sel tanpa perlakuan (kontrol sel) sebesar 11,87% menjadi 27,43%. Akumulasi sel dimungkinkan karena terjadi *cell cycle arrest* di fase tersebut.

Perlakuan sel dengan fraksi etil asetat pada konsentrasi terendah yang tidak menyebabkan kematian sel, yakni meningkatkan populasi sel pada fase S. Telah diketahui bahwa progresi daur sel diregulasi oleh aktivasi yang berurutan dari cyclin atau kompleks CDK yang spesifik dalam tiap fase siklus sel. Pada fase G1 dan S, regulasi sel dihambat oleh *cyclin-dependent kinase inhibitor* (CKI) seperti protein INK4 dan CIP/KIP serta *tumor suppressor genes*, yakni *pRB* dan *p53*. Pada penelitian ini digunakan sel T47D yang mengalami mutasi *p53* sehingga mekanisme antikanker fraksi etil asetat dimungkinkan melalui jalur *p53 independent*.

*Independent pathway* dari status *p53* dan terjadinya S *arrest* kemungkinan karena penurunan aktivitas Cdc25A secara cepat akibat peristiwa *ubiquitination* dan degradasinya oleh proteasome. Kehilangan aktivitas Cdc25A fosfatase tersebut menggagalkan aktivitas CDK2 kinase dengan mengihibisi defosforilasi CDK2 pada treonin 14 dan tirosin 15. Fosforilasi Cdc25A diperantarai oleh jalur cascade ATM/ATR-Chk2/Chk1 (Falck et al, 2001, Mailand et al, 2000). Degradasi Cdc25A fosfatase yang tergantung pada ATM-Chk2 dimana menginhibisi CDK2 akan menginisiasi cdc45 (*replication checkpoint*) yang mereduksi kecepatan replikasi DNA sehingga replikasi DNA terhenti dan memicu S *arrest* (Costanzo et al, 2000).

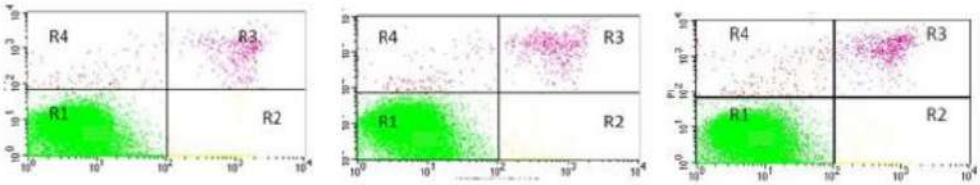
Jalur p38MAPK juga berperan dalam inhibisi siklus sel pada fase S, yang dapat terjadi melalui *p53-independent*. Protein p38 dapat secara langsung memfosforilasi dan menstabilkan p21 *in vivo* (Kim et al, 2002). Protein p38 juga dapat memfosforilasi dan mempromosikan degradasi Cdc25A yang berkontribusi terhadap penghentian siklus sel pada fase S (Goloudina et al, 2003). Pada sel tumor dengan mutasi *p53*, diketahui terjadi pengurangan respon terhadap agen-agen yang menginduksi apoptosis dan tumor tersebut kemungkinan menjadi resisten terhadap obat antineoplastik yang memiliki target pengrusakan DNA. Adanya mutasi pada *p53* akan menyebabkan agen kemoterapi, seperti doksorubisin, tidak dapat mengaktivasi *p53* melalui interkalasi DNA dan berinteraksi dengan topoisomerase IIa (Crafword and Bowen, 2002). Sel T47D dapat menjadi resisten terhadap doksorubisin yang dikarenakan mutasi pada gen *p53* (Di Leo et al, 2007, Vayssade et al, 2005). Fraksi etil asetat pada dosis rendah dapat dikembangkan menjadi agen ko-kemoterapi dengan agen kemoterapi yang lain.

Aktivitas antikanker fraksi etil asetat sebagai agen penginduksi *arrest* (penghentian siklus sel) pada fase S, dapat dikembangkan lebih lanjut melalui peningkatan aktivitasnya dengan penambahan agen perusak *arrest*. Ketika sel kanker defisien *p53* diberi agen perusak DNA, kemudian dikombinasikan dengan agen yang mampu merusak mekanisme pertahanan sel (*checkpoint*) pada fase S, maka akan memicu sel memasuki fase mitosis dengan masih membawa DNA yang rusak, sehingga berakhir dengan apoptosis dan kematian sel (*mitotic cathastrope*). Mekanisme perusakan *checkpoint* ini merupakan strategi yang dapat digunakan untuk secara selektif membunuh sel kanker yang mengalami *defect* pada gen *p53*, dengan tetap melindungi sel normal yang mempunyai gen *p53 wild type* (Eastman et al, 2002, Ma et al, 2010, Wang et al, 2001). Beberapa contoh senyawa yang telah dilaporkan sebagai *abrogator S checkpoint* antara lain AZD7762, melalui inhibisi fosforilasi oleh Chk1 dan Chk2 terhadap Cdc25A dengan menggunakan Gemcitabine sebagai senyawa penginduksi S *arrest* (Zabludoff et al, 2008), ICP-1, yang merupakan analog UCN01, mampu merusak (*abrogator*) S *arrest* dan meningkatkan efek sitotoksik yang diinduksi oleh cisplatin hanya pada sel yang defektif *p53*, baik ICP-1 maupun UCN01 dapat menginhibisi *checkpoint* kinase Chk1 dan atau Chk2 (Eastman et al, 2002).




a. b. c.

**Gambar 4.** Deteksi distribusi siklus sel menggunakan *flow cytometry*. a. Kontrol sel, b.Perlakuan ciplatin, c. Perlakuan fraksi etil asetat. $5x10^5$sel ditanam dalam 6 *well plate* dan diinkubasi 24 jam dalam media DMEM *high glucose* tanpa atau dengan perlakuan. Deteksi flow *cytometry* menggunakan reagen PI terhadap sel T47D setelah perlakuan fraksi etil asetat 4µg/ml dan Cisplatin 2,5 µM dan kombinasi ketiganya. Analisis *flow cytometry* menggunakan *flowing*.




a b c

**Gambar 5.** Efek induksi apoptosis setelah perlakuan etil asetat dan Cisplatin. (a) kontrol sel, (b) perlakuan cisplatin, (c) perlakuan fraksi etil asetat. Sel ditanam dengan kerapatan $5x10^5$ dalam 6-*well plate* dan diinkubasi selama 24 jam dalam media DMEM High glucose tanpa atau dengan perlakuan. Deteksi flowcytometry terhadap kematian sel menggunakan Annexin V FLUOS terhadap sel kanker payudara T47D setelah perlakuan fraksi etil asetat 4 µg/ml, perlakuan cisplatin 2,5 µM cisplatin. Kuadran R1 menunjukkan sel yang hidup, R2: apoptosis awal, R3: apoptosis akhir, R4: nekrosis.

## Uji Apoptosis Fraksi Etil Asetat

Induksi apoptosis diamati untuk mengetahui mekanisme sel akibat perlakuan dari fraksi etil asetat dan Cisplatin pada sel kanker payudara T47D yang diinkubasi selama 24 jam. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode Annexin V yang dideteksi menggunakan *flow cytometry* untuk melihat induksi apoptosis yang terjadi pada sel yang diberikan perlakuan. Annexin V merupakan anggota dari keluarga protein pengikat fosfolipid yang pada membran sel bermuatan negatif secara kuat. Kematian sel yang diakibatkan apoptosis atau nekrosis dapat dibedakan dengan pewarnaan *Propidium Iodide* (PI) melalui interkalasi dengan DNA (Zhang et al, 1997). Hasil pengujian induksi apoptosis dengan menggunakan *flow cytometry* (Gambar 5) dan persentase kematian sel setelah mengalami perlakuan fraksi etil asetat dan cisplatin yang diakibatkan karena apoptosis atau nekrosis ditunjukkan pada Tabel 3.

Analisis persentase kematian sel setelah perlakuan fraksi etil asetat dan cisplatin menunjukkan sel yang tidak diberi perlakuan memperlihatkan persentase kehidupan sel sebesar 96,61% dan sebesar 3,39 % sel mengalami kematian. Sel yang mengalami perlakuan cisplatin

memperlihatkan kematian sel sebesar 6,65% dan sel yang mengalami perlakuan fraksi etil asetat memperlihatkan kematian sel sebesar 11,88 %. Hal tersebut menunjukkan bahwa persentase kematian sel akibat perlakuan etil asetat mengalami peningkatan dibandingkan dengan ciplatin sebesar 5,23%.

Sel T47D merupakan sel kanker payudara yang memiliki karakteristik caspase-3 *wildtype*, caspase-7 *wildtype*, ER/PR positif dan p53 *mutant* (Schafer et al, 2000). Induksi apoptosis yang terjadi dimungkinkan melalui mekanisme apoptosis yang tidak bergantung p53. Cisplatin dilaporkan mampu menginduksi *downregulation* Bcl-2 pada sel kanker payudara T47D (Mokhtar et al, 2012) dan mampu membentuk *crosslink* DNA sehingga dapat menyebabkan kerusakan DNA yang menginduksi terjadinya apoptosis (Jamieson and Lippard, 1999). *Downregulation* Bcl-2 (protein antiapoptosis) akan menurunkan ketahanan hidup sel dan meningkatkan sensitivitas terhadap agen kemoterapi (Biswas et al, 2004). Hasil memperlihatkan fraksi etil asetat meningkatkan apoptosis dan mengalami modulasi siklus sel pada fase S. Terjadi modulasi pada fase S atau terjadinya S *arrest* maka sel tidak mampu bereplikasi, dan mengakibatkan sel tidak berproliferasi. Efek tersebut juga dimungkinkan karena fraksi memiliki beberapa kandungan senyawa sehingga besar kemungkinan terjadinya efek antagonisme antar senyawa, sehingga perlu dikaji kembali dengan menganalisis induksi apoptosis senyawa-senyawa yang terkandung pada fraksi etil asetat. Diperlukan penelitian lanjutan untuk mengetahui protein-protein yang terlibat dalam mengetahui mekanisme molekuler yang memperantarai sinergisme senyawa pada fraksi etil asetat, ekspresi protein p53, Bcl-2, dan NF-Kß secara *in vitro* pada sel kanker payudara T47D.

**Tabel 1.** Hasil Uji Sitotoksik Fraksi terhadap Sel T47D dan Vero

| Fraksi | $EC_{50}$ T47D (µg/mL) | $EC_{50}$ Vero (µg/mL) | *Selectivity index* (SI) |
|---|---|---|---|
| *n*-heksana | 220,13±1,23 | 345,27±2,52 | 1,57 |
| etil asetat | 24,88±2,43 | 376,87±1,87 | 15,15 |
| metanol | 139,12±1,54 | 390,98±1,43 | 2,81 |
| etanol | 182,42±4,72 | 435,11±0,87 | 2,38 |

*Rerata±SD

**Tabel 2.** Persentase Distribusi Siklus Sel setelah Perlakuan Cisplatin dan Fraksi Etil Asetat pada Sel Kanker Payudara T47d

| Sampel | G1 Phase (%) | S Phase (%) | G2/M Phase (%) | % CV |
|---|---|---|---|---|
| Kontrol | 48,65 | 11,87 | 24,75 | 8,87 |
| Cisplatin | 41,86 | 13,12 | 27,54 | 9,45 |
| Fraksi etil asetat | 25,87 | 27,43 | 17,40 | 6,87 |

**Tabel 3.** Persentase Kematian Sel setelah Perlakuan Cisplatin dan Fraksi Etil Asetat Pada sel T47D

| | Tanpa perlakuan | Fraksi etil asetat (4 µg/mL) | Cisplatin (2,5 µM) |
|---|---|---|---|
| Apoptosis awal (%) | 1,43±0,27 | 8,89±0,65 | 2,65±0,81 |
| Apoptosis akhir (%) | 1,09±0,12 | 1,34±0,52 | 2,98±0,23 |
| Nekrosis (%) | 0,87±0,08 | 1,65±0,87 | 1,02±0,09 |
| Total | 3,39±0,32 | 11,88±0,51 | 6,65±0,43 |

*Rerata±SD

# Fraksi Etil Asetat Kulit Batang-JFSK 2017-1

ORIGINALITY REPORT

| 22% | 18% | 5% | 11% |
|---|---|---|---|
| SIMILARITY INDEX | INTERNET SOURCES | PUBLICATIONS | STUDENT PAPERS |

PRIMARY SOURCES

| | | |
|---|---|---|
| 1 | www.mapeki.org<br>Internet Source | 2% |
| 2 | Submitted to Surabaya University<br>Student Paper | 1% |
| 3 | www.permataindonesia.ac.id<br>Internet Source | 1% |
| 4 | eprints.uny.ac.id<br>Internet Source | 1% |
| 5 | repository.usu.ac.id<br>Internet Source | 1% |
| 6 | jurnal.akfarsam.ac.id<br>Internet Source | 1% |
| 7 | Submitted to Universitas Brawijaya<br>Student Paper | 1% |
| 8 | vdocuments.site<br>Internet Source | 1% |
| 9 | repository.ubaya.ac.id<br>Internet Source | 1% |

| | | |
|---|---|---|
| 10 | psr.ui.ac.id<br>Internet Source | 1% |
| 11 | wschristopher.org<br>Internet Source | 1% |
| 12 | Submitted to Udayana University<br>Student Paper | 1% |
| 13 | journal.uin-alauddin.ac.id<br>Internet Source | 1% |
| 14 | tuinxbie2.blogspot.com<br>Internet Source | 1% |
| 15 | Submitted to iGroup<br>Student Paper | 1% |
| 16 | Submitted to Padjadjaran University<br>Student Paper | 1% |
| 17 | docslide.us<br>Internet Source | 1% |
| 18 | journal.ipb.ac.id<br>Internet Source | <1% |
| 19 | Submitted to Universitas Islam Indonesia<br>Student Paper | <1% |
| 20 | Ernie Halimatushadyah, Muhammad Da'i, Muhammad Nursid. "Sitotoksisitas dan Induksi Apoptosis Ekstrak Etanol Teripang holothuria atra Jaeger, 1833 pada beberapa Sel Kanker", | <1% |

Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, 2018
Publication

| | | |
|---|---|---|
| 21 | Submitted to Program Pascasarjana Universitas Negeri Yogyakarta<br>Student Paper | <1% |
| 22 | Submitted to Universitas Sanata Dharma<br>Student Paper | <1% |
| 23 | Fitrilya Mustikahati Yusuf, Nurkhasanah Nurkhasanah. "Evaluasi Kadar Kurkumin dalam Jamu Tradisional Kunir Asam yang Dijual di Pasar Kota Gede Bulan Februari 2015", Pharmaceutical Sciences and Research, 2015<br>Publication | <1% |
| 24 | Submitted to Universitas Jenderal Soedirman<br>Student Paper | <1% |
| 25 | www.mdpi.com<br>Internet Source | <1% |
| 26 | haiyulfadhli.blogspot.com<br>Internet Source | <1% |
| 27 | journal.unhas.ac.id<br>Internet Source | <1% |
| 28 | Submitted to Houston Community College<br>Student Paper | <1% |
| 29 | real-phd.mtak.hu | |

Internet Source

<1%

| | | |
|---|---|---|
| 30 | uad.portalgaruda.org<br>Internet Source | <1% |
| 31 | Wiwin Herdwiani, Soemardji AA, Elfahmi ., Tan MI, Nabila K, Anita K. "Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol Kulit Buah Pinang (Areca catechu) dan Daun Kayu Manis (Cinnamomum burmanni)", Jurnal Farmasi Indonesia, 2019<br>Publication | <1% |
| 32 | ijpst.or.id<br>Internet Source | <1% |
| 33 | repository.usd.ac.id<br>Internet Source | <1% |
| 34 | text-id.123dok.com<br>Internet Source | <1% |
| 35 | Submitted to Forum Perpustakaan Perguruan Tinggi Indonesia Jawa Timur<br>Student Paper | <1% |
| 36 | Submitted to Universitas Andalas<br>Student Paper | <1% |
| 37 | fr.scribd.com<br>Internet Source | <1% |
| 38 | issuu.com<br>Internet Source | <1% |

| | | |
|---|---|---|
| 39 | anzdoc.com<br>Internet Source | <1% |
| 40 | Submitted to Universitas Indonesia<br>Student Paper | <1% |
| 41 | zenodo.org<br>Internet Source | <1% |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Exclude quotes | Off | Exclude matches | Off |
| Exclude bibliography | On | | |

# Fraksi Etil Asetat Kulit Batang-JFSK 2017-1

GRADEMARK REPORT

FINAL GRADE

/0

GENERAL COMMENTS

**Instructor**

PAGE 1

PAGE 2

PAGE 3

PAGE 4

PAGE 5

PAGE 6

PAGE 7

PAGE 8

PAGE 9

PAGE 10

PAGE 11