

Kandungan Kimia dan Aktivitas Sitotoksik Ekstrak dan Fraksi Herba Anting-anting terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7

Maya Febriyanti, Supriyatna, dan Rizky Abdulah

ABSTRACT: *Acalypha indica*, belongs to Euphorbiaceae family, is annual herb which distributed widely in Asia, including Indonesia. Extract and fraction of *Acalypha indica* were screened for phytochemical constituents and investigated for its cytotoxicity against human breast cancer MCF-7 using MTT assay. Ethanolic extract of *A.indica* showed cytotoxicity against MCF-7 with an IC_{50} 225 μ g/ml. While for the fraction, ethyl acetate fraction showed best cytotoxicity compared to n-hexane and water fraction with an IC_{50} 387 μ g/ml. Phytochemical screening to the ethyl acetate fraction showed that the fraction contain flavonoids, polyphenols, monoterpenes and sesquiterpenes, triterpenoids, and quinones.

Keywords : *Acalypha indica*, cytotoxicity, MCF-7, MTT assay

ABSTRAK: *Acalypha indica*, famili Euphorbiaceae, merupakan herba yang terdistribusi secara luas di Asia termasuk Indonesia. Pada penelitian ini dilakukan penapisan kimia pada ekstrak dan fraksi *A. indica* dan uji sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 dengan metode MTT assay. Ekstrak etanol *A. indica* menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap sel MCF-7 dengan IC_{50} 225 μ g/ml. Sedangkan hasil uji sitotoksik terhadap fraksi menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memberikan aktivitas yang paling baik dibandingkan fraksi n-heksan dan air dengan IC_{50} 387 μ g/ml. Hasil penapisan fitokimia menunjukkan bahwa fraksi etil asetat *A.indica* mengandung senyawa flavonoid, polifenol, monoterpen dan seskuiterpen, triterpenoid, dan kuinon.

Kata kunci : *Acalypha indica*, sitotoksisitas, MCF-7, MTT assay

Program Pascasarjana, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran

Korespondensi:

Maya Febriyanti

Email : maya.febriyanti@gmail.com

PENDAHULUAN

Kanker merupakan salah satu penyakit degeneratif yang membutuhkan perhatian khusus, karena sebagian penderita kanker berakhir dengan kematian. Diperkirakan ada 10,9 juta kasus baru; 6,7 juta kematian; dan 24,6 juta pasien kanker di seluruh dunia pada tahun 2002 (1). Berdasarkan data dari *Globocan International Agency for Research on Cancer (IARC)* tahun 2008, kanker payudara menempati urutan pertama dari seluruh jenis kanker pada perempuan di dunia. Angka insidensi kanker payudara sebanyak 22,9% serta angka mortalitas sebesar 13,7% per tahun (2).

Pengobatan kanker yang tersedia saat ini terfokus pada pemusnahan sel kanker melalui operasi, radioterapi atau kemoterapi. Kelemahan dari metode-metode tersebut, kemoterapi misalnya, adalah efisiensi dan selektifitas yang rendah serta toksisitas yang tinggi terhadap sel-sel normal. Oleh karena itu perlu dikembangkan alternatif lain untuk meningkatkan efisiensi terapi sekaligus mengurangi toksisitas terhadap sel-sel bukan kanker.

Saat ini, hampir 88% populasi global menggunakan obat yang berasal dari bahan alam sebagai lini pertama untuk menjaga kesehatan dan pertahanan terhadap penyakit. 119 metabolit sekunder digunakan sebagai obat secara global (3).

Acalypha indica L. adalah herba tahunan yang banyak ditemukan di Asia dan Afrika hingga ke Polinesia. Digunakan secara tradisional untuk pengobatan gatal gatal, reumatik, artritis, dan penyembuhan luka (4).

Ekstrak petroleum eter *A. indica* menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Aeromonas hydrophilla*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger*, dan *Escherichia coli* (5).

Penelitian juga telah dilakukan untuk mengevaluasi potensi antibakteri ekstrak daun *Acalypha indica* terhadap sembilan bakteri patogen yaitu *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae* and *Pseudomonas aeruginosa* menunjukkan

bahwa ekstrak etanol daun *Acalypha indica* (100 mg/ml) memberikan zona inhibisi maksimum terhadap *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis* (30 mm). Sedangkan terhadap *Staphylococcus aureus*, ekstrak memberikan zona inhibisi yang lebih kecil (12 mm) (6).

Beberapa senyawa kimia telah diisolasi dari *A. indica* antara lain : tanin, pirakuinolinon, alkaloid flindersin, glikosida kaempferol, mauritanin, kloroflorin, nicotiflorin, dan biorobin (7).

Pada pengujian yang dilakukan oleh Radji *et al.*, tahun 2008 terhadap efek toksisitas dengan cara *brine shrimp lethality test* (BSLT) menggunakan *Artemia salina* Leach menunjukkan bahwa nilai LC₅₀ ekstrak etanol *A. indica*, adalah 1,279 ug/ml (8).

Namun sampai saat ini belum ada penelitian yang menguji aktivitas sitotoksik ekstrak dan fraksi *A. indica* terhadap sel kanker payudara MCF-7. Oleh sebab itu pada penelitian ini akan dilakukan pengujian aktivitas sitotoksik dan penapisan fitokimia ekstrak etanol dan fraksi *A. indica* terhadap sel kanker payudara MCF-7 dengan metode *MTT assay*.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia *Acalypha indica* Linn. diperoleh dari Kebun Tanaman Obat Manoko, Jawa Barat, sel kanker payudara MCF-7 (RSP UNPAD), medium RPMI-1640, *serum fetal bovine*, dan antibiotik (100 U/ml penisilin dan 100 µg/ml streptomisin). Pereaksi yang digunakan antara lain : etanol 95%, aquadest, etil asetat, *n*-heksana, asam sulfat pekat, kloroform, metanol, serbuk Mg, asam klorida pekat, asam nitrat 0,15 N, hidrogen peroksida, asam asetat anhidrat, larutan FeCl₃, pereaksi, asam sulfat pekat 10 % dalam metanol, pereaksi Mayer, dan pereaksi Dragendorf.

METODE

Ekstraksi

Daun *A. indica*, yang telah diiris-iris dan dikeringkan kemudian diekstraksi dengan etanol

96% menggunakan metode maserasi selama 3 x 24 jam. Maserat kemudian ditampung dan pelarutnya diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40-50°C sehingga dihasilkan ekstrak kental.

Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair. Ekstrak *A. indica* ditimbang dan dilarutkan dalam air suling kemudian difraksinasi menggunakan n-heksana dan etil asetat. Ekstrak ditimbang sebanyak 15-30 gram, dan dilarutkan dalam air suling sebanyak 300 mL. Larutan ekstrak dimasukkan pada corong pisah dan ditambahkan pelarut n-heksana sebanyak jumlah air suling yang digunakan (perbandingan 1:1). Campuran tersebut dikocok sambil sesekali mengeluarkan gas yang dihasilkan. Corong pisah didiamkan hingga terbentuk dua lapisan yang terpisah antara fase air dan fase n-heksana. Lapisan n-heksana diambil dan ditampung, kemudian lapisan fase air ditambahkan n-heksana kembali dengan jumlah yang sama dan perlakuannya diulangi hingga lapisan fase n-heksana jernih. Lapisan air ditambahkan etil asetat sebanyak 300 mL dan diperlakukan seperti pada fraksi n-heksana. Perlakuan diulangi hingga lapisan fase etil asetat jernih. Hasil dari ekstraksi cair-cair diperoleh tiga fraksi, yaitu fraksi n-heksana, fraksi etil, dan fraksi air. Ekstrak, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air kemudian diuapkan.

Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan terhadap ekstrak dan fraksi *A. indica*. Metode yang digunakan adalah metode Farnsworth (9).

1. Senyawa Alkaloid

Sampel (serbuk simplisia dan ekstrak) dibasakan dengan amonia encer (10%), digerus dalam mortir, kemudian ditambahkan kloroform sambil terus digerus. Lapisan kloroform dipipet sambil disaring, kemudian ke dalamnya ditambahkan asam klorida 2 N. Campuran dikocok kuat-kuat hingga terbentuk dua lapisan. Lapisan asam dipipet, kemudian dibagi menjadi 3 bagian dan diperlakukan sebagai

berikut:

- Filtrat 1 ditambahkan pereaksi Mayer, terjadinya kekeruhan atau endapan putih menunjukkan adanya alkaloid.
- Filtrat 2 ditambahkan pereaksi Dragendorff, terjadinya endapan jingga kuning hingga coklat menunjukkan adanya alkaloid.
- Filtrat 3 digunakan sebagai blanko.

2. Senyawa Flavonoid

Sampel dipanaskan dengan campuran logam magnesium dan asam klorida 5 N, kemudian disaring. Adanya flavonoid akan menyebabkan filtrat berwarna merah yang dapat ditarik dengan amil alkohol. Untuk lebih memudahkan pengamatan, sebaiknya dilakukan percobaan blanko.

3. Senyawa Polifenolat dan Tanin

Sampel digerus dan dipanaskan dengan air di atas tangas air, kemudian disaring panas-panas. Sebagian kecil filtrat ditetesi larutan besi (III) klorida. Terbentuknya warna biru-hitam menunjukkan adanya polifenolat alam dan tanin. Sebagian kecil filtrat diuji ulang dengan penambahan larutan gelatin 1%. Adanya endapan putih menunjukkan bahwa dalam simplisia terdapat tanin.

4. Senyawa Saponin

Sampel dicampur dengan air dalam tabung reaksi dan dipanaskan beberapa saat di atas tangas air, kemudian disaring. Setelah dingin filtrat dalam tabung reaksi dikocok kuat-kuat selama kurang lebih 30 detik. Pembentukan busa setinggi sekurang-kurangnya 1 cm dan persisten selama beberapa menit serta tidak hilang pada penambahan 1 tetes asam klorida encer menunjukkan bahwa dalam simplisia terdapat saponin.

5. Senyawa Monoterpenoid dan Seskuiterpenoid

Sampel disari dengan eter, kemudian sari eter diuapkan hingga kering. Pada residu ditetesi pereaksi anisaldehyd-asam sulfat atau vanillin-asam sulfat. Terbentuknya warna-warna menunjukkan adanya senyawa monoterpenoid dan seskuiterpenoid.

6. Senyawa Steroid dan Triterpenoid

Sampel disari dengan eter, kemudian diuapkan hingga kering. Pada residu diteteskan pereaksi Liebermann-Burchard. Terbentuknya warna ungu menunjukkan bahwa dalam simplisia terkandung senyawa kelompok triterpenoid, sedangkan bila terbentuk warna hijau-biru menunjukkan adanya senyawa kelompok steroid.

7. Senyawa Kuinon

Sampel digerus dan dipanaskan dengan air, kemudian disaring. Filtrat ditetesi larutan natrium hidroksida. Terbentuknya warna kuning hingga merah menunjukkan adanya senyawa kelompok kuinon.

Pengujian Aktivitas Sitotoksik terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7

1. Kultur dan Perlakuan Sel

Untuk pengujian aktivitas digunakan sel line kanker payudara MCF-7. Sel dikultur dalam medium RPMI-1640 yang ditambahkan dengan 10% *serum fetal bovine* dan antibiotik (100 U/ml penisilindan 100 µg/ml streptomisin) dan diinkubasi dalam inkubator CO₂.

2. Uji Aktivitas

Analisis proliferasi sel dilakukan terhadap sel uji yang ditambahkan beberapa variasi konsentrasi ekstrak menggunakan metode *Methyl Thiazolil Tetrazolium (MTT assay)*, dengan prosedur: Sel (2x10⁴ dalam 50 µL/lubang) ditempatkan dalam 96 lubang *plate well*. Setelah terjadi perbanyakan sel, beberapa variasi konsentrasi ekstrak ditambahkan dan diinkubasi selama 24 jam. Kemudian 10 µL WST-8 *cell counting solution* ditambahkan ke dalam masing-masing lubang dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 jam. Reaksi MTT dihentikan dengan penambahan reagen *stop-per* SDS (100 µL). Sel yang hidup bereaksi dengan MTT membentuk warna kuning. Hasil pengujian dibaca dengan *microtiter plate reader* pada panjang gelombang 550 - 600 nm.

Tingkat inhibisi proliferasi sel (CPI : Cell Proliferation Inhibition rate) dihitung dengan rumus :

$$\left(1 - \frac{\text{Optical density of treated cells}}{\text{Optical density of control}}\right) \times 100$$

Dari pengujian aktivitas sitotoksik diperoleh IC₅₀ ekstrak dan fraksi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi, Fraksinasi, dan Penapisan Fitokimia

Acalypha indica L, merupakan golongan tumbuhan dalam famili *Euphorbiaceae* yang banyak tumbuh di daerah tropis termasuk Indonesia. *Acalypha* banyak digunakan sebagai obat tradisional di beberapa negara, tetapi penggunaannya sebagai obat di Indonesia masih belum banyak diketahui.

Sebanyak 3 kg serbuk simplisia herba anting-anting diekstraksi dengan metode maserasi selama 3 x 24 jam. Dari proses maserasi diperoleh ekstrak pekat sebanyak 346,24 gram (11,54%).

Selanjutnya dilakukan fraksinasi terhadap ekstrak *A. indica* dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut *n*-heksana, etil asetat, dan air. Prinsip ekstraksi cair-cair adalah perbedaan koefisien partisi. Koefisien partisi adalah perbandingan kelarutan komponen dalam dua fase karena perbedaan kepolaran kedua fase cair tersebut.

Metode ekstraksi cair-cair dipilih sebagai pemisahan awal untuk memudahkan pemisahan tahap selanjutnya karena senyawa pada hasil ekstraksi cair-cair akan terpisah berdasarkan kepolaran masing-masing sesuai prinsip *like dissolves like*. Sejumlah ekstrak kental difraksinasi dengan *n*-heksana dan etil asetat sebagai pelarut organik. Dari fraksinasi diperoleh fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air. Masing-masing fraksi kemudian dipekatkan kembali menggunakan *rotary evaporator*. Penguapan dilanjutkan di atas *water bath* sehingga diperoleh berat konstan. Hasil ekstraksi cair-cair dari 225,28 g ekstrak kental diperoleh 49,61 g fraksi *n*-heksana kental, 24,17 g fraksi etil asetat kental, dan 149,53 g fraksi air kental.

Pada ekstrak dan fraksi dilakukan penapisan fitokimia untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder dalam fraksi n-heksan, etil asetat, dan air ekstrak *A. indica*. Hasil penapisan fitokimia ditampilkan pada Tabel 1 dan 2.

Uji Aktivitas Sitotoksik Ekstrak dan Fraksi

MTT assay merupakan uji *in vitro* yang menggunakan kultur sel untuk mendeteksi adanya aktivitas antineoplastik pada ekstrak tumbuhan dan senyawa aktif hasil isolasi sebagai penapisan awal untuk mendapatkan obat-obat sitostatik. Sistem ini merupakan uji kualitatif dengan cara menetapkan kematian sel.

Pada penelitian ini digunakan *cell line* MCF-7 sebagai model sel kanker payudara. Sebagai kontrol negatif digunakan pelarut DMSO. Kadar DMSO tertinggi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0,3 % (v/v) yaitu pada konsentrasi 500 µg/mL. Analisa untuk sel MCF-7 tanpa perlakuan

dan dengan perlakuan blangko DMSO menunjukkan profil pertumbuhan yang relatif sama, hal ini menunjukkan bahwa penggunaan pelarut DMSO sampai dengan kadar 0,3 % dalam uji tidak berpengaruh pada sel MCF-7.

Hasil pengukuran dengan menggunakan *microplatereader* menunjukkan bahwa persentase kematian sel MCF-7 terus meningkat sebanding dengan kenaikan konsentrasi ekstrak yang diberikan.

Aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 terdeteksi dengan adanya absorbansi sel dalam bentuk warna. Sel hidup membentuk kompleks formazan berwarna kuning akibat reaksi reduksi garam tetrazolium MTT pada rantai respirasi mitokondria sel hidup tersebut. Pada penelitian ini terjadi perubahan intensitas warna pada kelompok perlakuan sesuai kadar ekstrak yang diberikan. Hasil pengujian aktivitas sitotoksik ekstrak *A.indica* ditampilkan pada Tabel 3 dan Gambar 1.

Tabel 1. Hasil Penapisan Fitokimia Ekstrak *A.indica*

Golongan	Ekstrak
Alkaloid	-
Flavonoid	+
Polifenol	+
Tanin	-
Monoterpenoid dan seskuiterpeneoid	+
Steroid	+
Triterpenoid	+
Kuinon	+
Saponin	-

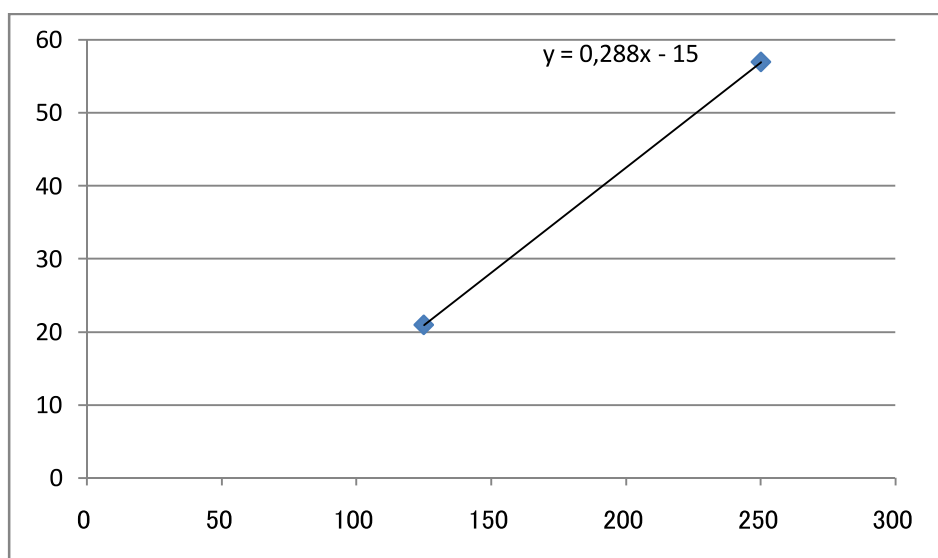
Tabel 2. Hasil Penapisan Fitokimia Fraksi N-Heksan, Etil Asetat dan Air *A. indica*

Golongan	Fraksi N-Heksan	Fraksi Etil Asetat	Fraksi Air
Alkaloid	-	-	-
Flavonoid	+	+	+
Polifenol	-	+	+
Tanin	-	-	-
Monoterpenoid	+	+	-
Steroid	+	+	-
Triterpenoid	+	+	-
Kuinon	-	-	+
Saponin	-	-	-

Keterangan : (+) = Terdeteksi (-) = Tidak terdeteksi

Tabel 3. Persen Kematian Sel MCF-7 Setelah Pemberian Ekstrak *A. indica*

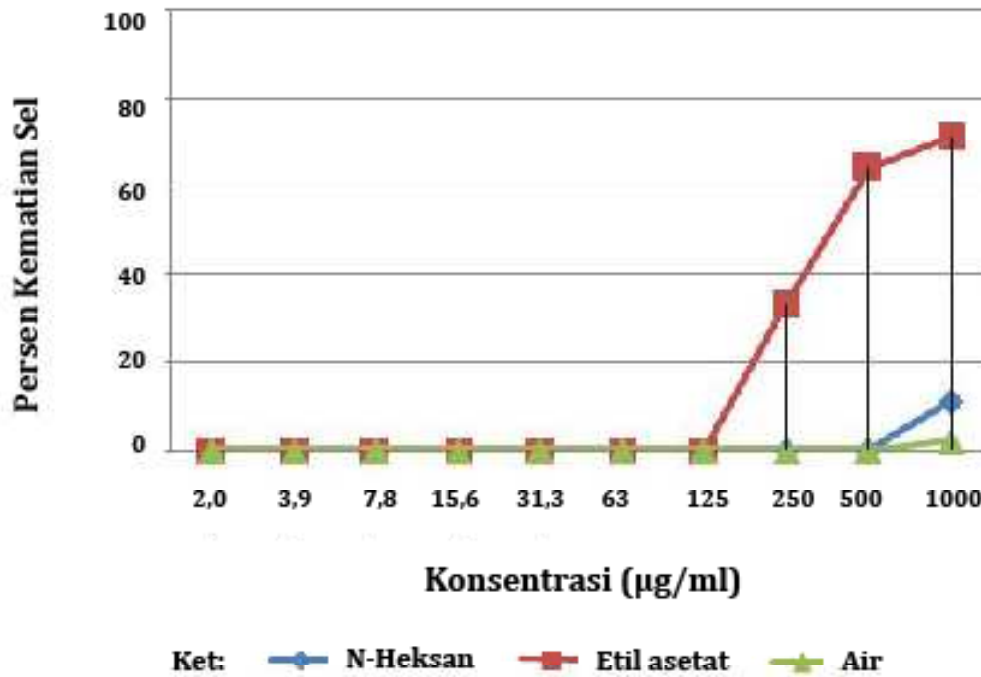
Konsentrasi (µg/ml)	% Kematian Sel
500	75
250	57
125	21
62,5	0
38	0
19	0
9,5	0
4,8	0



Gambar 1. Persen Kematian Sel MCF-7 Setelah Pemberian Ekstrak *A. indica*

Tabel 4. Persen Penghambatan Fraksi N-Heksan, Etil Asetat, dan Air Ekstrak *A. indica* terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7

Konsentrasi (µg/ml)	% Kematian Sel		
	Fraksi N-Heksan	Fraksi Etil Asetat	Fraksi Air
500	11	64	2
250	0	33	0
125	0	0	0
62,5	0	0	0
38	0	0	0
19	0	0	0
9,5	0	0	0
4,8	0	0	0



Gambar 2. Perbandingan Aktivitas Sitotoksik Fraksi N-Heksan, Etil Asetat, dan Air *A. indica* terhadap Sel Kanker MCF-7

Dari data di atas diperoleh nilai IC_{50} ekstrak adalah 225 µg/ml.

Aktivitas fitofarmaka suatu ekstrak tidaklah tergantung pada banyaknya kandungan senyawa, akan tetapi pada struktur dan sifat senyawa dalam tumbuhan. Dengan demikian dilakukan fraksinasi terhadap ekstrak anting-anting untuk mengetahui fraksi aktif yang berperan dalam aktivitas sitotoksik tumbuhan anting-anting. Hasil pengujian aktivitas sitotoksik fraksi ditampilkan pada Tabel 4.

Perhitungan nilai IC_{50} dengan menggunakan persamaan regresi linier diperoleh nilai IC_{50} fraksi etil asetat 387 µg/ml sementara fraksi n-heksan dan air tidak dapat ditentukan nilai IC_{50} -nya karena pada konsentrasi uji fraksi n-heksan dan air tidak dapat menyebabkan kematian sel MCF-7 di atas 50%. Berdasarkan hasil percobaan tersebut fraksi etil asetat memiliki potensi efek sitotoksik terbesar dibanding fraksi n-heksan maupun air terhadap sel MCF-7. Perbandingan aktivitas sitotoksik masing-masing fraksi ditampilkan pada Gambar 2.

Dari hasil pengujian dapat disimpulkan bahwa

senyawa yang memiliki aktivitas sitotoksik dalam tumbuhan anting-anting bersifat semi polar sehingga larut dalam pelarut semi polar yaitu etil asetat.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa ekstrak *A. indica* memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 dengan IC_{50} 225 µg/ml. Sedangkan dari ketiga fraksi yang diuji hanya fraksi etil asetat yang dapat ditentukan nilai IC_{50} -nya yaitu 387 µg/ml, sementara fraksi n-heksan dan air tidak dapat ditentukan. Dari hasil skrining fitokimia diketahui bahwa ekstrak *A. indica* mengandung senyawa : flavonoid, polifenol, monoterpen dan seskuiterpen, triterpenoid, dan kuinon, sedangkan fraksi etil asetat yang merupakan fraksi yang memiliki aktivitas sitotoksik paling baik mengandung senyawa : flavonoid, polifenol, monoterpen, steroid, dan triterpenoid.

DAFTAR PUSTAKA

1. Manju, Kharb, Jat R.K, Anju, Gupta. A Review On Medicinal Plants Used as A Source of Anticancer Agents. *Int. J. Drug Res. Tech.* 2012. Vol. 2 (2) : 177-183.
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. 2010. GLOBOCAN. 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet] Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, Available from: <http://globocan.iarc.fr>. Diakses 2 November 2012.
3. Kintzios and Spiridon, E. Terrestrial plant derived anticancer agents and plant species used in anticancer research. *Critical Rev. Plant Sci.* 2006 (25) : 79-135.
4. Reddy, J. S., P. R. Rao., and M. S. Reddy. Wound healing effects of *Heliotropium indicum*, *Plumbago zeylanicum* and *Acalypha indica* in rats. *Journal of Ethnopharmacology.* 2002 (79) : 249-251.
5. Solomon, R. D. J., S. Kallidass., and J. Vimalan. Isolation, identification and study of antimicrobial property of a bioactive compound in an Indian medicinal plant *Acalypha indica* (Indian-nettle). *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21. 2005: 1231-1236.
6. Saranraj P, D. Stella, K. Sathiyaseelan and Sajani Samuel. Antibacterial Potentiality of Ethanol and Ethyl Acetate Extract of *Acalypha indica* against Human Pathogenic Bacteria. *Journal of Ecobiotechnology.* 2010 (2/7): 23-27.
7. Nahrstedt, A., J. D. Kant., and V. Wray. Acalyphin, a cyanogenic glucoside from *Acalypha indica*. *Phytochemistry.* 1982 (21): 101-105.
8. Radji M, Sari RC, Sumiati A. Uji Aktivitas Antimikroba Dan Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol Akar Tanaman Akar Kucing (*Acalypha indica* Linn), Daging Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Sheff) Boerl) Dan Sari Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam). *Majalah Ilmu Kefarmasian.* 2008. Vol. V: 40 - 46.
9. Farnsworth, N. R. Biological and Phyto-chemical Screening of Plant. *J. Pharm. Sci.* 1966. 55(3): 243-269.