

IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA ANTI KANKER PAYUDARA *IN VITRO* PADA TIGA VARIETAS BUAH MERAH (*Pandanus conoideus* Lamk.)

Sasi Hermanto

MTsN Model Darrusalam Martapura

Abstract: Cancer was one of health problems in the world. Medical treatments of cancer by operation, chemotherapy, and radiation were really good, but they have some effects. Now, people were interested in using of natural product as medicine. Red fruit (*Pandanus conoideus* Lamk.) have been extensively used to treat HIV/AIDS, diabetic mellitus, uric acid, osteoporosis and cancer. The scientific studies of anti cancer activity of red fruits on the growth of cancer are relatively very few. The objective of this research was to determine the variety of Red Fruit that have the high toxicity and to identify the bioactive compound that have a cytotoxic effect on breast cancer cell line (T47D). Three samples (Maler, Barugum, and Yanggiru) were collected from Sentani (Papua). The cell line used were T47D for breast cancer and cancer drug Doxorubicine was used as a standard on cytotoxicity assay. All samples were extracted using three solvents (chloroform, methanol, and water). Anti cancer activity on breast cancer cell line of those extracts were detected using MTT Assay to determine IC-50. The best extract (lowest IC-50) was fractionated, isolated, and identified its compound group. The value of extract IC-50 and toxic isolate were calculated by probit analysis. The results showed that methanol extract of Barugum has the highest cytotoxic effect to cell line T47D (IC-50 = 170,204 $\mu\text{g/ml}$) followed by chloroform extract of Maler (IC-50 = 193,090 $\mu\text{g/ml}$). But, the isolate of fraction of Maler chloroform extract had the highest cytotoxic effect (IC-50 = 32,453 $\mu\text{g/ml}$), that is lower than Doxorubicine (49,194 $\mu\text{g/ml}$) while the isolate of methanol extract of Barugum had IC-50 = 60,298 $\mu\text{g/ml}$. The bioactive compound group that has anti-cancer activity were terpenoid saponin and other terpenoids. It could be concluded that the chloroform extract of Maler was potential to be developed as cancer medicine.

Key Words: Red Fruit, cancer, T47D, cytotoxic, MTT Assay.

PENDAHULUAN

Kanker masih menjadi masalah dalam kesehatan di dunia. Hal ini dikarenakan morbiditas dan mortalitas kanker cenderung meningkat (Sukardja, 2000) sedangkan angka keberhasilan pengobatan masih rendah, apalagi bila sudah dalam stadium lanjut (Diananda, 2007). Menurut WHO, penderita kanker setiap tahun bertambah sekitar 6,25 juta orang (Triningsih, 2002) dan tahun 2000 sampai 2020 diprediksikan akan terjadi peningkatan kejadian kanker sampai mencapai 50% (Datamonitor, 2005).

Kanker payudara merupakan kanker yang paling banyak diderita oleh wanita di seluruh dunia dengan insidensi yang meningkat 1-2% tiap tahun (Basu *et al.*, 2004). Di Indonesia, kanker ini menduduki peringkat kedua setelah kanker serviks dengan kasus kejadian 17,77% (Tjindarbumi dan Mangunkusumo, 2002).

Sampai saat ini, pengobatan kanker yang efektif dan efisien belum ditemukan, sehingga para peneliti memberi perhatian besar pada pencarian obat kanker baru (Sugiyanto *et al.*, 2003). *National Cancer Institute* (NCI) di Amerika telah meneliti sekitar 500 tanaman tiap tahunnya (sebagian besar tanaman diperoleh dari hutan hujan tropis) dan melaporkan bahwa obat kanker yang efektif merupakan senyawa yang diperoleh dari produk alam (Kinghorn *et al.*, 2000).

Buah merah (*Pandanus conoideus* Lamk.) merupakan tumbuhan endemik. Eksplorasi buah merah di Papua dan Irian Jaya Barat mendapatkan 75 batang bibit pandan dan pandan liar yang dikelompokkan menjadi 30 varietas lokal (Hadad dan Trisilawati, 2006). Dari semua varietas ini, ada tiga tipe warna buah yaitu merah, coklat, dan kuning. Buah merah secara empiris telah digunakan oleh masyarakat untuk pengobatan berbagai penyakit degeneratif, seperti HIV/AIDS, diabetes, asam urat, osteoporosis dan kanker (Budi dan Paimin, 2005). Namun secara ilmiah pengaruh buah merah terhadap sel kanker belum banyak diteliti.

Varietas, jenis ekstrak, dan fraksi buah merah yang mempunyai efek anti kanker belum diketahui. Senyawa bioaktif yang berkhasiat anti kanker juga belum diidentifikasi. Oleh karena itu perlu

dilakukan penelitian untuk mengetahui varietas, jenis ekstrak dan fraksi buah merah yang berkhasiat anti kanker, serta mengidentifikasi senyawa bioaktifnya.

METODE PENELITIAN

Ekstraksi dan Monitoring Kandungan Senyawa

Biji buah merah pada bagian pangkal, tengah dan ujung diambil masing-masing seberat 50 g, diekstraksi secara berjenjang dengan Soxhlet menggunakan 150 ml kloroform dan 150 ml metanol. Ampas dimaserasi dengan 80 ml aquadest selama 5 jam dan disaring. Kandungan kimia sembilan macam ekstrak dimonitor dengan KLT menggunakan fase diam silika gel 60 F₂₅₄ dan fase gerak kloroform : etil asetat = 12 : 1 v/v, diamati pada cahaya tampak, dibawah sinar UV dengan λ 254 nm dan 366 nm, kemudian disemprot dengan Cerium (IV) Sulfat.

Uji Sitotoksitas Ekstrak dengan MTT Assay

Potensi sitotoksik masing-masing ekstrak diuji secara bertahap pada sel line T47D dengan metode *MTT Assay*. Pengujian I dilakukan pada seri kadar 100; 50; 25; 12,5 dan 6, 25 $\mu\text{g/ml}$ sedangkan pengujian II pada seri kadar 500; 400; 300; 200; dan 100 $\mu\text{g/ml}$. Ekstrak toksik kemudian diuji dengan seri kadar 300; 250; 200; 150; dan 100 $\mu\text{g/ml}$ untuk menentukan nilai IC-50.

Sebanyak 100 μl suspensi sel yang berisi $1,0 \times 10^4$ *cell line* dimasukkan dalam setiap sumuran *microwell plate* 96, diinkubasi selama 24 jam, kemudian ditambah 100 μl ekstrak dengan berbagai seri dosis dan diinkubasi lagi selama 24 jam. Media kultur DMEM dibuang, dicuci dengan 100 μl PBS, ditambah 110 μl MTT, dan diinkubasi kembali. Setelah 4 jam ditambah 100 μl SDS 10%, dishaker selama 5 menit, disimpan pada suhu kamar selama 24 jam, dan absorbansinya dibaca dengan *ELISA reader* pada λ 595 nm. Uji sitotoksitas dilakukan dengan 3 ulangan, kontrol sel dan kontrol media.

Fraksinasi dan Uji Sitotoksitas Fraksi

Ekstrak paling toksik difraksinasi dengan VLC (*Vacuum Liquid Chromatography*) menggunakan fase diam serbuk silika gel 60 F₂₅₄ dan berbagai fase gerak. Pemilihan fase gerak disesuaikan dengan sifat kepolaran ekstrak dan diurutkan dari yang bersifat non polar sampai yang bersifat polar. Fraksi yang didapatkan dimonitor dengan KLT dan yang mempunyai pola kromatogram mirip digabungkan. Semua fraksi gabungan diuji sitotoksiknya dengan dosis terendah yang mampu membunuh sel T47D 100%, sehingga didapatkan fraksi toksik.

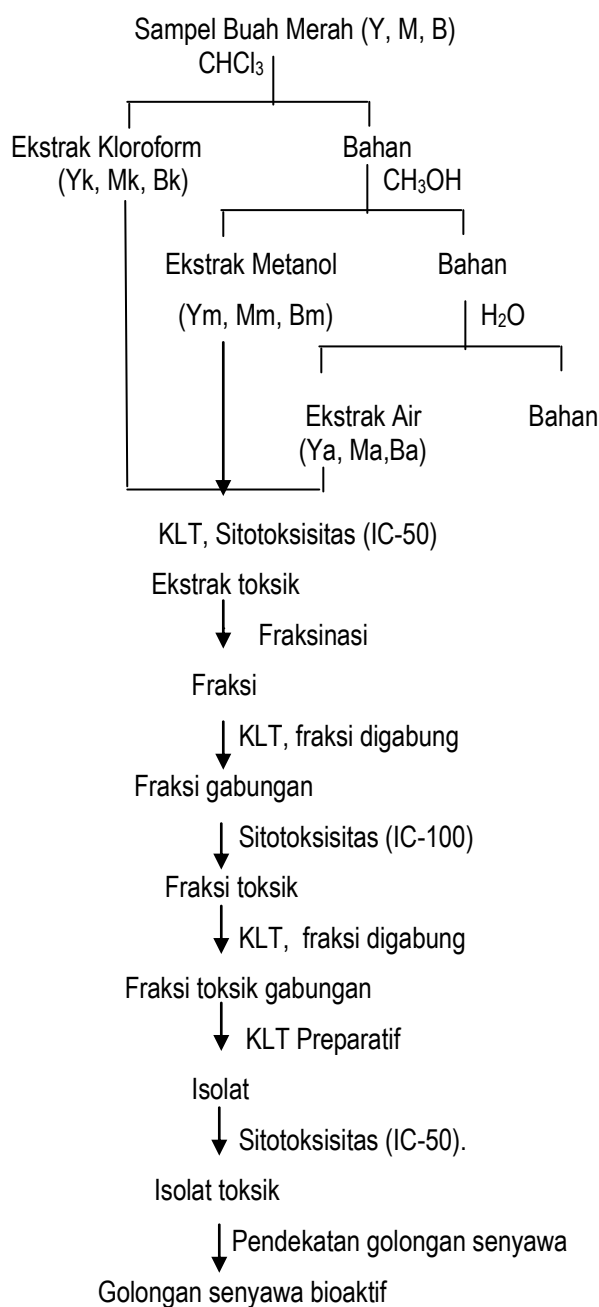
Isolasi dan Uji Sitotoksitas Isolat

Fraksi toksik dipisahkan dengan KLT preparatif menggunakan fase diam silika gel 60 PF₂₅₄ dan fase gerak kloroform : etil asetat = 10 : 1 v/v. Bercak pita pada plate kaca dibagi menjadi 3 bagian (atas, tengah, dan bawah) dan dikerok. Hasil kerokan dilarutkan dengan kloroform : metanol = 9 : 1 v/v, dihomogenkan, disaring dengan *scintared glass* sambil divakum, dan dikeringanginkan. Monitoring komponen kimia isolat dilakukan dengan KLT menggunakan fase gerak kloroform: etil asetat = 10 : 1 v/v.

Uji sitotoksitas isolat dilakukan dalam beberapa tahap skrining dengan dosis tunggal mulai dari dosis terendah yang mampu membunuh sel 100%, dilanjutkan dengan penurunan dosis secara bertahap sampai diperoleh isolat yang paling toksik. Penentuan IC-50 isolat toksik dilakukan dengan 4 seri kadar, yaitu 100; 50; 25; 12,5 $\mu\text{g/ml}$ dengan pembandingan obat kanker Doxorubicin (EBEWE Austria). Uji ini dilakukan dengan 3 ulangan, kontrol sel dan kontrol media.

Deteksi Golongan Senyawa Bioaktif Isolat Toksik

Deteksi golongan senyawa bioaktif dalam isolat toksik dilakukan dengan KLT menggunakan berbagai penampak bercak, seperti UV λ 254 nm, UV λ 366 nm, uap I₂, uap ammonium, Cerium (IV) Sulfat, Liebermann-Bouchard, Vanilin-Asam Sulfat, Sitroborat dan Dragendorff. Fase gerak yang digunakan adalah n-Heksana : Aseton = 2 : 1 v/v. Bagan alur penelitian ditunjukkan pada gambar 1.



Gambar 1. Bagan Alur Kerja Penelitian

Keterangan :

Y = Yanggiru

Yk = Kloroform Yanggiru

Ym = Methanol Yanggiru

Ya = Air Yanggiru

M = Maler

Mk = Kloroform Maler

Mm = Methanol Maler

Ma = Air Maler

B = Barugum

Bk = Kloroform Barugum

Bm = Methanol Barugum

Ba = Air Barugum

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan Monitoring Kandungan Kimia Ekstrak

Sampel buah merah yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah merah varietas lokal Barugum (warna merah bentuk segitiga), Maler (warna merah bentuk panjang), dan Yanggiru (warna kuning bentuk panjang). Ketiga sampel buah merah tersebut ditunjukkan pada gambar 2.



Gambar 2. Sampel Buah Merah
a. Barugum b. Yanggiru c. Maler

Dalam penelitian ini, ekstraksi dilakukan dengan metode soxhlet secara berjenjang menggunakan tiga macam cairan pengekstraksi dari yang bersifat non polar ke yang lebih polar, yaitu kloroform, metanol, dan aquadest. Senyawa yang bersifat non polar pada sampel diharapkan larut dalam kloroform, senyawa semi polar larut dalam metanol, dan senyawa polar larut dalam air. Hasil ekstraksi dicantumkan pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil ekstraksi Tiga Varietas Buah Merah (masing-masing 150 gram)

Penyari	Yanggiru (Y)	Maler (M)	Barugum (B)
Kloroform (k)	Yk Minyak Kuning 23,60 gr (15,73%)	Mk Minyak merah 22,74 gr (15,16%)	Bk Minyak merah 14,49 gr (9,66%)
Methanol (m)	Ym Minyak kuning kecoklatan 11,54 gr (7,69%)	Mm Pasta merah kehitaman 14,53 gr (9,69%)	Bm Pasta merah kehitaman 21,08 gr (14,05%)
Air (a)	Ya Padat coklat 2,39 gr (1,59%)	Ma Padat coklat 1,42 gr (0,95%)	Ba Padat coklat 1,89 gr (1,26%)

Sebelum diujikan ke sel kanker, semua ekstrak dimonitor dengan KLT untuk melihat profil kandungan senyawa yang terdapat dalam ekstrak. Monitoring ini dimaksudkan untuk mengetahui apakah terjadi tumpang tindih kandungan senyawa antar ekstrak. Jika terdapat tumpang tindih, maka uji sitotoksitas belum memberikan gambaran yang sebenarnya antar ekstrak tersebut.

Uji Sitotoksitas Ekstrak dengan MTT Assay dan Penentuan IC-50

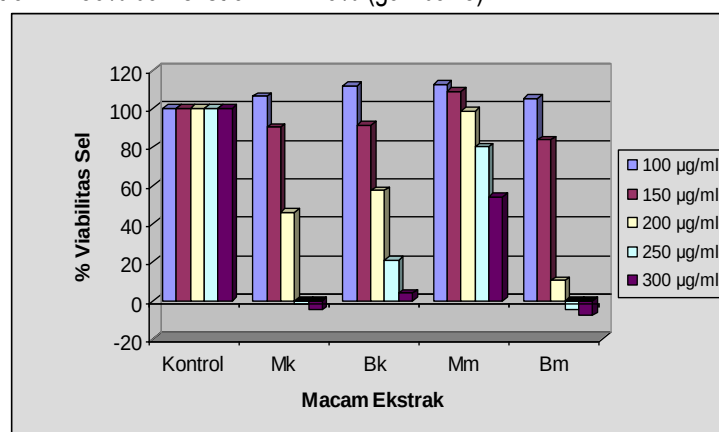
Uji sitotoksitas dilakukan untuk menentukan potensi sitotoksik suatu senyawa terhadap sel (Castell dan Lechon, 1997). Sitotoksitas suatu bahan dinyatakan dengan IC-50. IC-50 diartikan sebagai kadar larutan uji yang dapat menimbulkan efek toksik pada 50% populasi sel. Semakin kecil nilai IC-50 suatu senyawa, semakin toksik senyawa tersebut (Doyle dan Griffiths, 2000).

Banyaknya viabilitas sel dalam media kultur diukur dengan metode MTT melalui aktivasi enzim sel yang didasarkan atas transformasi dan kolorimetri dari MTT (Freimoser *et al.*, 1999). Sensitivitas MTT assay tergantung pada tipe sel, status metabolisme, dan teknik yang dipilih untuk melarutkan kristal formazan (Chapdelaine, 2007).

Garam tetrazolium MTT {3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida} yang merupakan substrat larut air berwarna kuning akan direduksi oleh enzim *succinic dehydrogenase*

mitokondria menjadi formazan yang berwarna ungu (Doyle dan Griffiths, 2000). Formazan yang terbentuk bersifat tidak larut air dan konsentrasinya proporsional dengan jumlah sel yang hidup pada berbagai jenis sel (Mosmann, 1983). Intensitas warna ungu yang terbentuk akan berkurang jika jumlah sel hidup hanya sedikit dan sel yang mati banyak, intensitas warna formazan diukur dengan ELISA reader pada λ 550 nm (Mosmann, 1983).

Hasil uji menunjukkan ekstrak Mk, Bk, Mm dan Bm bersifat toksik, sedangkan ekstrak Yk, Ym, Ya, Ma, dan Ba tidak bersifat toksik sampai pada dosis 500 $\mu\text{g/ml}$. Untuk mengetahui ekstrak paling toksik di antara empat ekstrak, selanjutnya diuji lagi dengan seri kadar 100; 150; 200; 250 dan 300 $\mu\text{g/ml}$. Hasil uji menunjukkan pada dosis 250 $\mu\text{g/ml}$, ekstrak Mk dan Bm mampu membunuh sel kanker T47D 100%, ekstrak Bk 80% dan ekstrak Mm 20% (gambar 3).



Gambar 3. Efek Toksik Empat Ekstrak Potensial Terhadap Sel T47D

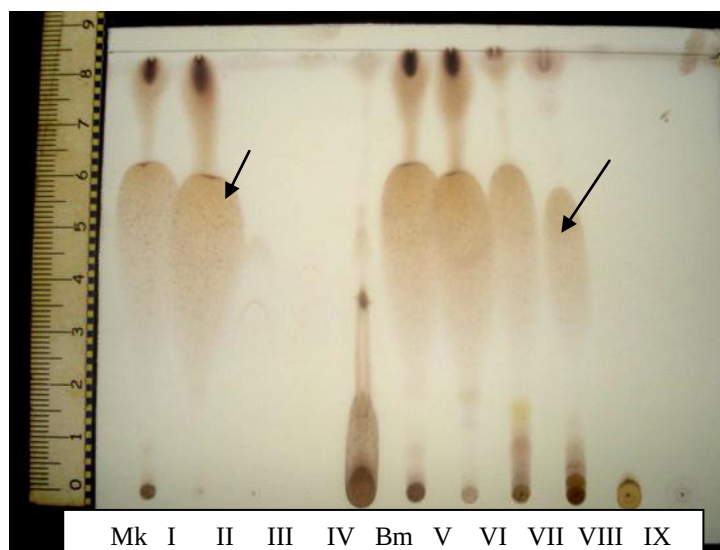
Nilai IC-50 dihitung dengan analisis probit, yaitu dengan membuat persamaan garis linier antara log kadar versus probit persen viabilitas sel, sehingga diperoleh ekstrak yang paling toksik (nilai IC-50 paling kecil). Nilai IC-50 empat ekstrak toksik terhadap sel T47D ditunjukkan pada tabel 2.

Tabel 2. Nilai IC-50 Empat Ekstrak Toksik Buah Merah Terhadap Sel T47D

Macam Ekstrak	Nilai IC-50 ($\mu\text{g/ml}$)
Kloroform Maler (Mk)	193,090
Kloroform Barugum (Bk)	206,999
Metanol Maler (Mm)	308,823
Metanol Barugum (Bm)	170,204

Fraksinasi, Uji Sitotoksisitas Fraksi Gabungan dan Monitoring KLT

Ekstrak Mk dan Bm difraksinasi dengan *Vacuum Liquid Chromatography* (VLC). Mk difraksinasi menjadi 17 fraksi sedangkan Bm menjadi 16 fraksi. Fraksi-fraksi ini dimonitor dengan KLT, fraksi yang mempunyai profil KLT mirip digabungkan. Hasil monitoring mendapatkan empat fraksi gabungan Mk (fraksi I, II, III, dan IV) dan lima fraksi gabungan Bm (fraksi V, VI, VII, VIII, dan IX). Kandungan kimia masing-masing fraksi gabungan ditunjukkan pada gambar 4.



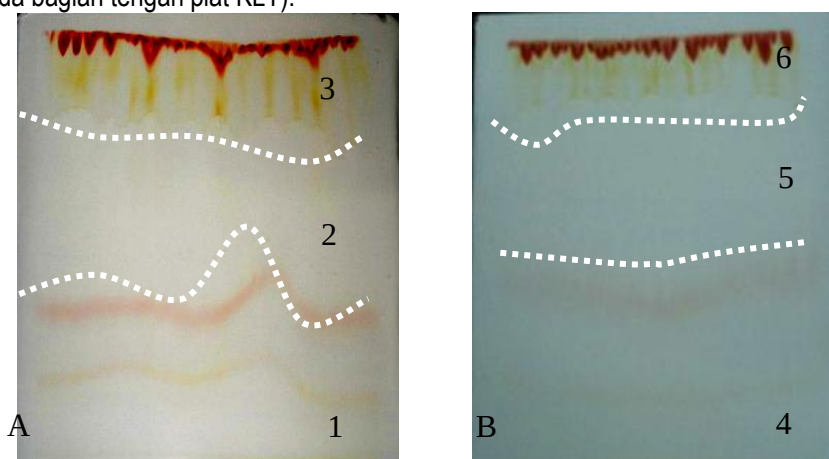
Gambar 4. Profil KLT Fraksi Gabungan dengan Eluen $\text{CHCl}_3 : \text{EtOAc} = 10:1$ v/v, Penampak Bercak $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$

Uji sitotoksik fraksi gabungan menghasilkan lima fraksi toksik, yaitu fraksi I, II, V, VI, dan VII. Dari gambar 4 tampak bahwa kelima fraksi toksik tersebut mempunyai bercak memanjang pada bagian tengah lempeng KLT (tanda panah), sehingga diduga bercak tersebut mewakili senyawa yang mempunyai efek sitotoksik terhadap sel T47D. Selanjutnya fraksi toksik yang memiliki profil kromatogram mirip digabung untuk menyederhanakan uji bioaktivitas menjadi fraksi A (gabungan I dan II) dan fraksi B (gabungan V, VI, dan VII).

Isolasi dan Uji Sitotoksitas Isolat

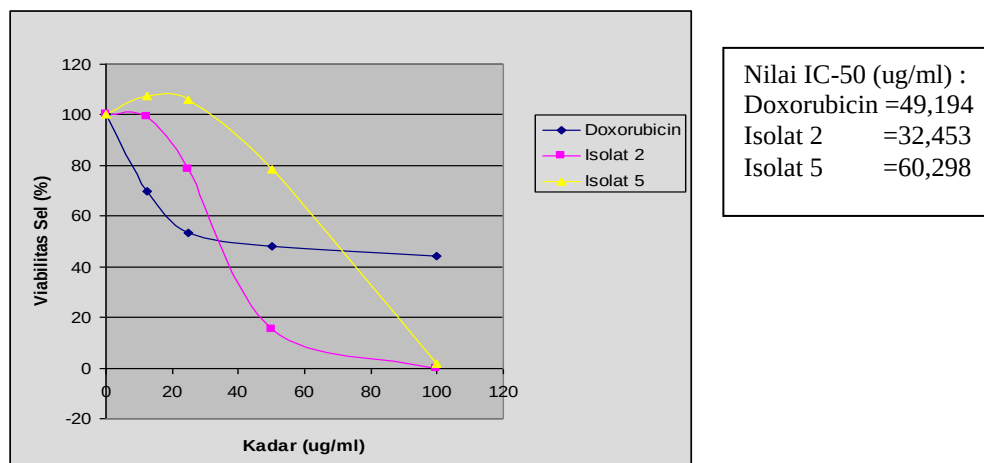
Isolasi fraksi toksik dilakukan dengan KLT preparatif menghasilkan 6 macam senyawa isolat (isolat 1, 2, 3, 4, 5, 6) dengan skema pembagian pada gambar 5.

Uji sitotoksitas senyawa isolat skrining I dengan dosis 250 $\mu\text{g/ml}$ (dosis terendah yang mampu membunuh sel T47D 100%) mendapatkan tiga isolat aktif, yaitu isolat 2, 5 dan 6. Sedangkan skrining II (dosis 200 $\mu\text{g/ml}$) mendapatkan dua isolat toksik, yaitu isolat 2 dan 5. Kedua isolat ini terdapat pada bagian tengah plat KLT).



Gambar 5. Skema Pembagian Isolat Toksik;
A. Ekstrak Mk B. Ekstrak Bm

Penentuan IC-50 isolat toksik dilakukan dengan 4 seri kadar, yaitu 100; 50; 25; 12,5 $\mu\text{g/ml}$ dengan pembanding obat kanker Doxorubicin. Grafik perbandingan sitotoksitas isolat buah merah dengan Doxorubicin terhadap sel kanker payudara beserta nilai IC-50 ditunjukkan pada gambar 6.

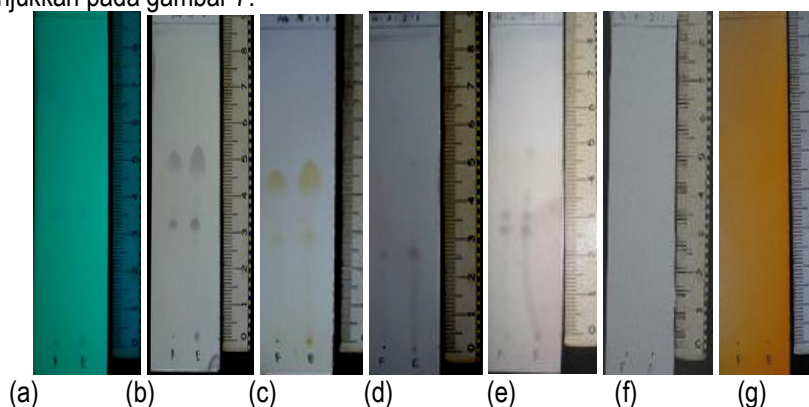


Gambar 6. Sitotoksisitas Isolat Buah Merah Dan Obat Kanker Doxorubicin Terhadap Sel T47D (n = 3)

Gambar 6 menunjukkan bahwa isolat 2 (isolat tengah) ekstrak kloroform Maler mempunyai efek sitotoksik paling tinggi terhadap sel T47D dengan IC-50 sebesar 32,453 $\mu\text{g/ml}$. Nilai IC-50 isolat ini lebih rendah dari obat kanker Doxorubicin dan mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai obat kanker.

Penentuan Golongan Senyawa Bioaktif Isolat Toksik

Identifikasi golongan senyawa bioaktif yang terdapat di dalam isolat dilakukan dengan metode KLT menggunakan berbagai penampak bercak yang spesifik. Penentuan golongan senyawa bioaktif ini perlu dilakukan untuk memudahkan melacak struktur kimianya. Hasil identifikasi golongan senyawa bioaktif ditunjukkan pada gambar 7.



Gambar 7. Profil KLT Identifikasi Isolat Toksik

- (a) dilihat di bawah sinar UV λ 254 nm, (b) disemprot $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ (c) diberi uap Iodium, (d) disemprot Liebermann-Bouchard, (e) disemprot Vanilin-Asam Sulfat (f) disemprot Sitroborat, (g) disemprot Dragendroff

Profil kromatogram pada gambar 7 menunjukkan bahwa kandungan senyawa bioaktif yang dominan dalam isolat toksik adalah terpenoid saponin yang spesifik terhadap pereaksi Liebermann-Bouchard dan terpenoid lain yang ditunjukkan dengan pereaksi vanilin-asam sulfat. Golongan senyawa tersebut merupakan senyawa organik yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi, tetapi ikatan rangkap yang dimiliki tidak membentuk gugus fenolik dan tidak membentuk rantai karbon yang panjang. Senyawa dalam isolat toksik bukan senyawa tunggal, hal ini ditunjukkan pada deteksi dengan Liebermann-Bouchard, vanillin asam sulfat, uap Iodium dan $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$. Isolat toksik tidak berupa

golongan flavonoid dan alkaloid, karena tidak menunjukkan adanya bercak spesifik pada deteksi dengan Sitroborat dan Dragendroff.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat fraksi ekstrak kloroform Maler mempunyai efek sitotoksik paling tinggi dengan IC-50 sebesar 32,453 µg/ml. Nilai tersebut lebih rendah dari IC-50 obat kanker Doxorubicin yang mempunyai IC-50 sebesar 60.298 µg/ml. Golongan senyawa bioaktif yang bertanggung jawab terhadap efek sitotoksik secara *in vitro* terhadap sel kanker payudara T47D adalah terpenoid saponin dan terpenoid lain. Penelitian lanjutan diperlukan untuk mengisolasi senyawa aktif tunggal dan menentukan struktur molekulnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Basu, G.D., Pathangey, L.B., Tinder, T.L., Gendler, S.J., and Mukherjee, P. 2004. Mechanisms Underlying the Growth Inhibitory Effects of the Cyclo-Oxygenase-2 Inhibitor Celecoxib in Human Breast Cancer Cell, *Journal from Breast Cancer Research*, 11: 632-642.
- Budi, I.M. dan F. R. Paimin. 2005. *Buah Merah*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Castell, J.V., and Lechon, M.G. 1997. *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research*, Academic Press, San Diego, California.
- Chapdelaine, J.M. 2007. MTT reduction — a tetrazolium-based colorimetric assay for cell survival and proliferation. <http://www.moleculardevices.com/>. Diakses 28 Juli 2008.
- Datamonitor. 2005. <http://www.detaildirect.com/>. diakses 2 Februari 2008.
- Doyle, A., and Griffiths, J.B. 2000. *Cell and Tissue Culture For Medical Research*, John Wiley and Sons Ltd, New York.
- Diananda, R. 2007. *Mengenal Seluk Beluk Kanker*, Katahati, Yogyakarta.
- Freimoser, F.M., Jakob, C.A., Aebi, M., and Tuor, U. 1999. The MTT {3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide} Assay Is a Fast and Reliable Method for Colorimetric Determination of Fungal Cell Densities, *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8): 3727-3729.
- Hadad, M.A.E. dan O Trisilawati. 2006. *Laporan Eksplorasi dan Konservasi Tanaman Buah Merah (Pandanus conoideus) Upaya Pengelolaan Sumber Daya Genetik yang Berkelanjutan*. Balittro. Bogor.
- Kinghorn, A.D., B. Cui, A. Ito, H.S. Chung, E.K. Seo, L. Long, L.C. Chang. 2000. Fractionation of Plants to Discover Substances to Combat Cancer, in Cutler, S.J. & H.G. Cutler, (Ed). *Biologically active Natural Products: Pharmaceuticals*. CRC Press, New York.
- Mosmann, T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2): 55-63.
- Sugiyanto, B. Sudarto, E. Meiyanto, A.E. Nugroho, U.A. Jenie. 2003. Aktivitas Antikarsinogenik Senyawa yang Berasal dari Tumbuhan. *Majalah Farmasi Indonesia*, 14 : 216-225.
- Sukardja, I.D.G. 2000. *Onkologi Klinik*, Airlangga University Press, Surabaya.
- Tjindrabumi, D. and R. Mangunkusumo. 2000. Cancer in Indonesia, Present and Future. *Jpn J Clin Oncol*; 32(supplement 1), p. 17-22.
- Triningsih, E. 2002. Kanker dan Permasalahannya dalam Seminar Pengobatan Komplementer pada Penderita Kanker, Yayasan Kucala Yogyakarta.