

**Selektivitas Ekstrak Etanolik Buah Makassar (*Brucea javanica*)  
pada Kanker Payudara Metastasis secara In Vitro**

**The Selectivity of Ethanolic Extract of Buah Makassar (*Brucea javanica*)  
on In Vitro Study of Metastatic Breast Cancer**

Ika Rahmawati Sutejo<sup>1,2</sup>, Herwandhani Putri<sup>2</sup>, Edy Meiyanto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Jember

Jl. Kalimantan 37, Jember 68121, Indonesia, Telp./Fax. (+62331) 337877

<sup>2</sup>Pusat Penelitian Kemoterapi Kanker, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada

Sekip Utara Yogyakarta, Indonesia

e-mail korespondensi: [ika.unej@gmail.com](mailto:ika.unej@gmail.com)

**Abstrak**

Modalitas terapi kanker berupa operasi, radioterapi dan kemoterapi memiliki banyak efek samping. Agen kemopreventif diperlukan untuk mengurangi efek samping dan meningkatkan efektivitas terapi kanker. Penemuan agen kemopreventif baru harus memperhatikan selektivitas. Agen kemopreventif yang selektif bekerja efektif pada sel kanker akan tetapi aman untuk sel normal. Buah Makassar (*Brucea javanica*) merupakan bahan alam yang secara empiris telah digunakan sebagai anti-inflamasi dan anti-kanker. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek sitotoksik ekstrak etanolik buah Makassar terhadap sel 4T1, MCF7, HeLa, dan Vero. Uji sitotoksitas dilakukan dengan MTT assay. Parameter yang diperoleh dari uji sitotoksik adalah IC<sub>50</sub>. Indeks selektivitas diperoleh dari rasio IC<sub>50</sub> suatu bahan pada sel kanker tertentu dibanding sel normal. Hasil penelitian ini menunjukkan ekstrak etanol buah Makassar memiliki aktivitas sitotoksik pada sel 4T1, MCF7, HeLa, dan Vero dengan IC<sub>50</sub> masing-masing sebesar 49,9 ± 0,83 µg/mL; 107,6 ± 8,14 µg/mL; 228,9 ± 4,16 µg/mL; dan 395,5 ± 4,21 µg/mL. Ekstrak etanolik buah Makassar juga terbukti memiliki selektivitas tinggi pada sel kanker payudara metastasis 4T1 dengan indeks selektivitas 7,93. Dapat disimpulkan bahwa buah Makassar berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen kemopreventif terutama pada kanker payudara metastasis.

**Kata kunci:** *Brucea javanica*, MTT assay, indeks selektivitas, 4T1, MCF7, HeLa, Vero

**Abstract**

*Cancer treatment i.e. surgery, radiotherapy and chemotherapy have many side effects. Chemopreventive agent is needed to reduce the side effect and increase effectivity of therapy. The discovery of chemopreventive agent should heed on its selectivity to reduce side effects. The selective chemopreventive agents work effectively in cancer cells and safe for normal cells. Buah Makassar (*Brucea javanica*) is a traditional medicinal plant that is empirically used for anti-inflammatory and antitumor. The purpose of this study was to determine the cytotoxic effect of ethanolic extract of buah Makassar against 4T1, MCF7, HeLa, and Vero cell lines. The cytotoxic test performed by MTT assay. The parameter obtained from the cytotoxic test was IC<sub>50</sub>. Selectivity index was determined from IC<sub>50</sub> ratio of cancer cells to normal cells. The results showed that ethanolic extract of buah Makassar had a cytotoxic activity with IC<sub>50</sub> of 49,9±0,83 µg/mL; 107,6±8,14 µg/mL; 228,9±4,16 µg/mL and 395,5± 4,21 µg/mL on 4T1, MCF7, HeLa, and Vero cells respectively. It also had high selectivity on 4T1 advance breast cancer cell line with selectivity index of 7,93. It can be concluded that the ethanolic extract of buah Makassar is potential to be developed as anticancer agent especially on metastatic breast cancer.*

**Keywords:** *Brucea javanica*, MTT assay, selectivity index, 4T1, MCF7, HeLa, Vero

## Pendahuluan

Penyakit kanker merupakan salah satu penyebab kematian utama di seluruh dunia. Pada tahun 2012, kanker menjadi penyebab kematian sekitar 8,2 juta orang (Globocan, 2012). Terdapat tiga modalitas terapi kanker, pembedahan, radioterapi, dan kemoterapi. Dua per tiga kasus kanker memerlukan kemoterapi untuk penanganannya. Penggunaan agen kemoterapi yang berkepanjangan dapat menimbulkan efek samping dan resistensi dikarenakan kurang selektifnya agen kemoterapi terhadap sel kanker. Fakta-fakta tersebut merupakan penyebab utama kegagalan dalam terapi kanker (Staerk *et al.*, 2002).

Saat ini, agen kemoprevensi bahan alam telah menjadi alternatif pilihan dalam pengobatan kanker, salah satunya adalah buah Makassar (*Brucea javanica*), yang dalam pengobatan tradisional dimanfaatkan untuk mengatasi diabetes, diare yang disebabkan oleh amoeba, malaria, bisul, mata ikan/kutil, ketombe, pembesaran limpa, sakit gigi, dan penurunan demam. Manfaat *Brucea javanica* sebagai antikanker telah terbukti pada beberapa macam kanker, akan tetapi belum pernah dibuktikan apakah efektifitas sebagai antikanker tersebut bersifat selektif untuk menghindari efek merugikan pada sel normal.

Potensi buah Makassar sebagai agen kemoprevensi kanker perlu ditegaskan melalui penelitian lebih lanjut. Penelitian ini mempelajari aktivitas sitotoksik ekstrak etanolik kayu secang pada beberapa sel kanker yaitu sel kanker payudara metastasis 4T1, sel kanker payudara MCF 7, dan sel kanker serviks HeLa. Kanker payudara dan kanker serviks merupakan jenis kanker yang paling sering diderita dan menjadi penyebab kematian utama akibat kanker pada wanita. Selektivitas buah Makassar dibuktikan dengan perbandingan sel epitel normal Vero melalui parameter nilai SI (*Selectivity Index*). Data-data ilmiah tersebut dapat menjadi dasar penggunaan buah Makassar sebagai agen kemopreventif yang aman dan selektif.

## Bahan dan Metode

### Bahan Tanaman

Bahan Tanaman yang digunakan adalah buah Makassar yang diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Proses ekstraksi tersebut dilakukan di Balai Penelitian Tanaman Obat (BPTO) Tawangmangu. Determinasi tanaman telah dilakukan oleh sebelumnya.

## Sel Line Kanker

Sel kanker manusia yang digunakan adalah sel kanker payudara 4T1 dan MCF7, sel kanker serviks HeLa, dan sel epitel normal Vero yang merupakan koleksi CCRC (Cancer Chemoprevention Research Center) Universitas Gajah Mada, Yogyakarta

### Bahan Kimia

Etanol 70%, Media *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI 1640) (Gibco), DMEM hi glucose (Gibco), *Fetal Bovine Serum* (FBS) (Sigma), Penisilin – streptomisin (Sigma), Amfoterizin B (Sigma), *Dimethyl sulfoxide* (DMSO), tripsin-EDTA (Sigma) (tripsin 0,25%), Tripkan Blue (Sigma), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) difenil tetrazolium bromida (MTT) (Sigma), *Sodium Duodecyl Sulfate* (SDS) dan *Phosphat Buffer Saline* (PBS) (Invitrogen).

### Uji sitotoksitas dengan metode MTT assay

Sel didistribusikan ke dalam sumuran (10.000 sel/sumuran untuk sel MCF7, HeLa dan Vero, 5.000 sel/sumuran untuk 4T1) kemudian diinkubasi hingga keadaan normal kembali. Setelah itu sel diinkubasi bersama berbagai seri kadar senyawa uji selama 24 jam pada inkubator 5% CO<sub>2</sub> dengan suhu 37°C. Pada akhir inkubasi, ke dalam masing-masing sumur ditambahkan 100 µl MTT 5 mg/ml dalam media. Diinkubasi kembali selama 4 jam. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu. Reaksi MTT dihentikan dengan reagen *stopper* (HCl 10% dalam SDS), diinkubasi semalam pada suhu kamar. Serapan dibaca dengan ELISA reader pada λ 595 nm.

### Analisis Data

#### 1. Perhitungan IC<sub>50</sub>

Data absorbansi dikonversi ke dalam persen sel hidup. Persen sel hidup dihitung menggunakan rumus :

$$\% \text{Hidup} = \frac{\text{Abs. sel perlakuan} - \text{Abs. kontrol media}}{\text{Abs. kontrol sel} - \text{Abs. kontrol media}} \times 100\%$$

Nilai viabilitas masing-masing sel pada perlakuan ekstrak dengan konsentrasi tertentu dianalisa dengan regresi linier untuk mendapatkan nilai IC<sub>50</sub> (konsentrasi tertentu yang menghasilkan 50% sel viabel).

#### 2. Perhitungan SI untuk Selektivitas

Selektivitas ditentukan dengan menggunakan parameter SI (*Selectivity Index*) dengan rumus

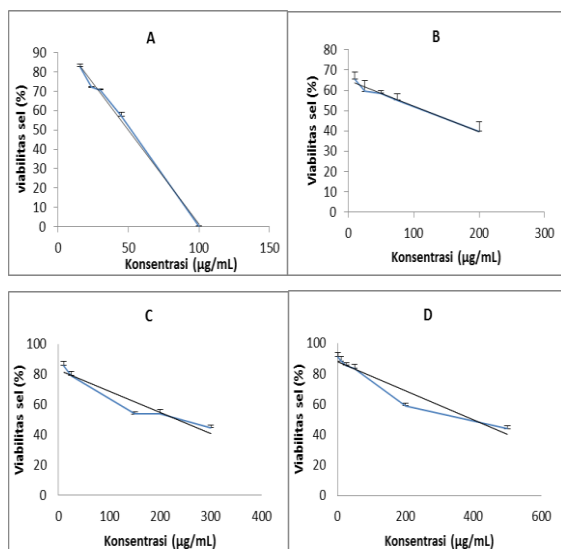
$$SI = \frac{IC_{50} \text{ pada sel Vero}}{IC_{50} \text{ pada sel kanker}}$$

Ekstrak dikatakan mempunyai selektivitas yang tinggi apabila nilai SI ≥ 3, dan dikatakan kurang selektif apabila nilai SI < 3.

## Hasil

### Uji sitotoksitas dengan MTT assay

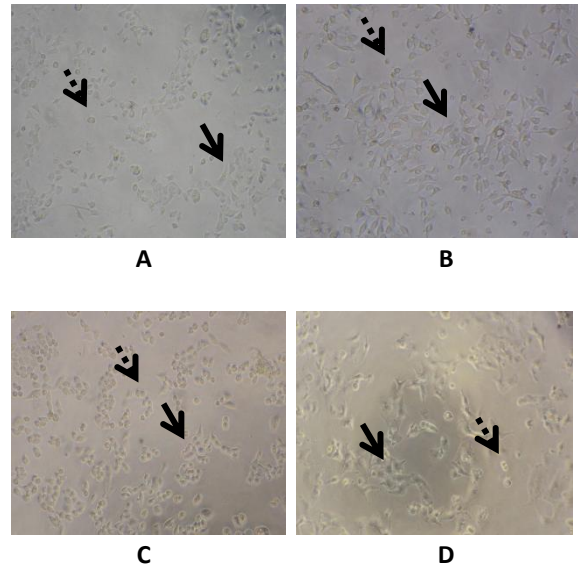
Pada uji sitotoksitas ekstrak etanolik buah Makassar terhadap sel 4T1, MCF7, HeLa dan Vero, hasil yang diperoleh menunjukkan ekstrak etanolik buah Makassar bersifat toksik dapat menghambat pertumbuhan sel kanker dengan fenomena dose dependent. yang ditunjukkan dengan efek toksik meningkat seiring peningkatan konsentrasi (gambar 1). Melalui pengamatan menggunakan mikroskop dapat diketahui bahwa perlakuan ekstrak etanolik buah Makassar memberikan perubahan terhadap morfologi sel 4T1, MCF7, HeLa dan Vero (gambar 2). Hasil analisis dengan regresi linier diperoleh nilai  $IC_{50}$  untuk masing-masing sel kanker, yang ditunjukkan pada tabel 1.



**Gambar 1.** Kurva linieritas persen viabilitas masing-masing sel kanker terhadap konsentrasi ekstrak etanolik buah Makassar: A. Sel kanker payudara 4T1, B. Sel kanker payudara MCF7, C. Sel kanker Cervix HeLa, D. Model sel epitel normal Vero

Tabel 1. Nilai  $IC_{50}$  Ekstrak Etanolik buah Makassar pada berbagai sel kanker

Sampel	Nilai $IC_{50}$			
	Sel 4T1	Sel MCF7	Sel HeLa	Sel Vero
Ekstrak etanolik buah Makassar	49,9±0,83	107,6±8,14	228,9±4,16	395,5±4,21



**Gambar 2.** Morfologi sel akibat perlakuan ekstrak etanolik buah Makassar: A. Sel kanker payudara 4T1, B. Sel kanker payudara MCF7, C. Sel kanker cervix HeLa, D. Sel epitel normal Vero,  
 → : Sel viabel  
 --> : Sel non viabel, mengalami perubahan morfologi menjadi bulat

### Penentuan Selektivitas

Selektivitas ekstrak etanolik buah Makassar dievaluasi dengan menggunakan parameter *Selectivity Index* (SI). Ekstrak dikatakan mempunyai selektivitas yang tinggi apabila nilai  $SI \geq 3$ , dan dikatakan kurang selektif apabila nilai  $SI < 3$ . Hasil analisa selektivitas menunjukkan bahwa ekstrak etanolik buah Makassar selektif terhadap sel 4T1 dan MCF7, namun kurang selektif pada sel HeLa (Tabel 2)

Tabel 2. Selektivitas Ekstrak Etanolik buah Makassar pada berbagai sel kanker

Jenis sel	Nilai SI	Interpretasi
4T1	7,93	Selektif
MCF7	3,66	Selektif
HeLa	1,73	Kurang selektif

### Pembahasan

Buah Makassar yang digunakan pada penelitian ini dalam bentuk ekstrak kasar. Ekstrak kasar seluruh tanaman terbukti bekerja lebih efektif daripada senyawa isolasi atau fraksi karena kombinasi sejumlah bahan aktif bekerja pada target reseptor berbeda sehingga dapat meningkatkan efek terapi secara keseluruhan.

Beberapa komponen dalam ekstrak kasar meskipun dalam konsentrasi kecil menciptakan sinergisitas. Aktivitas tersebut hanya didapat saat berada dalam ekstrak kasar dan tidak akan didapatkan ketika isolat senyawa aktif dikombinasikan (Rosoanaivo, 2011). Etanol 70% digunakan sebagai penyari pada proses ekstraksi karena polaritasnya mampu melarutkan berbagai senyawa dalam bahan alam, termasuk resin, lemak, minyak, karbohidrat, dan senyawa organik lain. Selain itu etanol tidak beracun dibanding pelarut lain, titik didihnya tidak terlalu tinggi (50-60 °C), mudah didapat, dan murah (Bart & Pilz, 2011).

Ekstrak etanolik buah Makassar bersifat sitotoksik terhadap sel 4T1, MCF7, HeLa dan Vero. Penelitian lain menyebutkan bahwa Buah Makassar menghambat pertumbuhan berbagai macam sel kanker, yaitu sel leukemia (Zhang *et al.*, 2011), kanker pankreas (Lau *et al.*, 2006), kulit, prostat, fibrosarkoma, kolon (Gao *et al.*, 2011), dan paru (Jiang, 2009). Kandungan kimia yang telah dapat diisolasi dan diduga berperan sebagai zat aktif dari buah Makassar adalah alkaloid (*brucamarine, yatanin*), glikosida (*brucealin, yatanoside A, kosamin*), fenol (*brucenol, bruceolic acid*), dan quassinoid (*javanicoside, javanicolide, yadanzolidia, brucein, brutasol, aglikon, yadanziosida, bruceosida, bruceantinosida*) (Kim *et al.*, 2004).

Perbedaan nilai IC<sub>50</sub> antar sel terjadi karena adanya perbedaan karakteristik masing-masing sel yang digunakan. Sel kanker payudara MCF-7 memiliki karakteristik resisten agen kemoterapi, mengekspresikan reseptor estrogen (ER +), overekspresi Bcl-2 dan tidak mengekspresikan caspase-3 (Onuki *et al.*, 2003; Prunet *et al.*, 2005). Sel kanker payudara metastasis 4T1 merupakan kanker payudara epitel duktus (positif E-cadherin), mengekspresikan p63, *smooth muscle actin/SMA*, & *cytokeratin 5/6*, bermetastasis jauh ke beberapa organ, antara lain paru, hati, otak, dan tulang (Tao *et al.*, 2008). 4T1 juga merupakan sel dengan level protein P53 rendah dan tidak mengekspresikan protein MMP2 (Tao *et al.*, 2008; Yerlikaya, Okur & Ulukaya, 2012).

Sel kanker serviks HeLa mengekspresikan 2 onkogen, yaitu E6 dan E7. Protein E6 berikatan dengan tumor suppressor protein p53 dan mempercepat degradasi p53 yang diperantarai ubiquitin dan menstimulasi aktivitas enzim telomerase. Sedangkan protein E7 mengikat bentuk aktif terhipofosforilasi dari p105Rb dan anggota lain dari famili Rb. Ikatan ini menyebabkan destabilisasi Rb dan pecahnya kompleks Rb/E2F yang berperan menekan transkripsi gen yang diperlukan untuk *cell cycle progression* (DeFilippis, *et al.*, 2003). sel HeLa

juga mempunyai gen p53 dan p105Rb dalam bentuk wild type (Goodwin dan DiMaio, 2000).

Selektivitas agen kemopreventif artinya hanya sel yang diidentifikasi sebagai sel kanker saja yang diserang, sementara sel normal tidak diserang. Mekanisme ini sangat berbeda dengan cara kerja obat kemoterapi yang menyerang sel kanker dan juga sel normal. Akibatnya sel normal ikut rusak dan mati yang berakibat pada timbulnya berbagai macam efek samping. Cara agen kemopreventif membedakan sel kanker dan sel normal adalah berdasarkan dari kebutuhan sel akan ATP (Adenosine Trifosfate). Karena sel kanker bergerak, tumbuh dan berduplikasi lebih cepat dan aktif dibandingkan sel normal, maka sel kanker membutuhkan energi ATP dalam jumlah yang lebih banyak. Hal ini akan dideteksi oleh agen kokemopreventif, selanjutnya bahan tersebut masuk ke dalam sel kanker dan menempel pada dinding dalam mitokondria untuk memblok produksi energi ATP. Akibatnya suplai energi untuk sel kanker terputus, sel kanker menjadi lemah dan akhirnya mati (Alali *et al.*, 1999).

Buah Makassar terbukti selektif bekerja pada sel 4T1, hal ini didukung oleh penelitian yang membuktikan bahwa Buah Makassar memiliki toksisitas rendah terhadap sel normal, sehingga digunakan sebagai agen kemopreventif pada pasien kanker hati berusia lanjut (Yang, 2011). Sel 4T1 yang digunakan pada penelitian ini diisolasi dari mencit, meskipun demikian memiliki karakteristik menyerupai sel kanker payudara manusia stadium lanjut yang mampu berproliferasi cepat, agresif, dan tidak responsif terhadap agen kemoterapi (Bao *et al.*, 2011).

## Kesimpulan

Ekstrak etanolik buah Makassar (*Brucea javanica*) dapat menghambat pertumbuhan beberapa sel kanker (4T1, MCF7, HeLa) dan sel normal Vero. Efek sitotoksitas ekstrak etanolik buah Makassar paling poten dan bekerja selektif pada sel kanker payudara metastasis 4T1, sehingga ekstrak ini mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai agen kokemoterapi pada kanker payudara metastasis. Meskipun demikian, masih diperlukan penelitian lebih lanjut untuk dapat mengaplikasikan kesimpulan tersebut pada pasien kanker.

## Ucapan Terimakasih.

Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi yang telah mendanai penelitian ini melalui Insentif Riset Sistem Inovasi Nasional 2014.

## Referensi

- Alali FQ, Liu XX, & McLaughlin JL. 1999. *Annonaceous Acetogenins: Recent Progress*. Journal of Natural Product. 62(3): 504-40.
- Bao L, et al. 2011. *Increased Expression of P-Glicoprotein is Associated with Doxorubicin Chemoresistance in the Metastatic 4T1 Breast Cancer Model*. Am J Patbol. 178:838-852; DOI:10.1016/j.ajpatb.2010.10.029.
- DeFillippis RA, et al. 2003. *Endogenous Human Papillomavirus E6 and E7 Proteins Differentially Regulate Proliferation, Senescence, and Apoptosis in HeLa Cervical Carcinoma Cells*. Journal of Virology. 77 (2): 1551-1563.
- Goodwin EC & DiMaio D. 2000. *Repression of Human Papillomavirus Oncogenes in HeLa Cervical Carcinoma Cells Causes the Orderly Reactivation of Dormant Tumor Suppressor Pathways*. Biochemistry. 97:23.
- Ferlay J, et al. 2013. *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide*. IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year.
- Fresney RI. 2005. *Culture of Animal Cell: A Manual of Basic Technique*. 5th Ed. John Wiley & Sons. 120-135.
- Gao H, et al. 2011. *Tumor Cell Selective Cytotoxicity & Apoptosis Induction by an Herbal Preparation from Brucea javanica*. N Am J Med Sci. 4(2):62-66.
- Jiang B, et al. 2009. *Effect of Brucea javanica Oil on Apoptosis & Vascular Endotelial Growth Factor Secretion of A549 Cells*. Chinese Pharmaceutical Journal. 2009-18
- Kim J, et al. 2010. *NF $\kappa$ B Inhibitors from Brucea javanica Exhibiting Intracellular Effect on Reactive Oxygen Species*. Anticancer research. 30: 3295-3300.
- Lou GG, Yao HP, & Xie LP. 2010. *Brucea javanica Oil Induces Apoptosis in T24 Bladder Cancer Cells via Upregulation of Caspase-3, Caspase-9, & Inhibition of NF-kappaB and COX-2 Expressions*. Am J Chin Med. 38(3):613-24.
- Mosmann T, 1983. *Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays*. Journal of Immunological Methods. 65: 55-63.
- Onuki R, et al. 2003, *Analysis of A Mitochondrial Apoptotic Pathway Using Bid-Targeted Ribozymes in Human MCF7 Cells in the Absence of A Caspase-3-Dependent Pathway*. Antisense and Nucleic Acid Drug Development. 13 (2): 75-82.
- Prayong P, Barusrux S, Weerapreeyakul N. 2008. *Cytotoxic Activity Screening of some Indigenous Thai Plants*. Fitoterapi. 79(7-8):598-601. doi: 10.1016/j.fitote.2008.06.007.
- Prunet C, et al. 2005, *Activation of Caspase-3-Dependent and -Independent Pathways During 7-Ketocholesterol- and 7 $\beta$ -Hydroxycholesterol-Induced Cell Death: A Morphological and Biochemical Study*. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology. 19 (5): 311-326.
- Rasoanaivo P, et al. 2011. *Whole Plant Extract versus Single Compounds for the Treatment of Malaria: Synergy & Positive Interations*. Malaria Journal. 10(1): 54.
- Sari, N. 2010. *Potensi Buah Makasar (Brucea javanica (L.) Merr) sebagai Inhibitor Enzim  $\alpha$ -Glukosidase Secara in Vitro*. Skripsi. Fakultas Matematika & Ilmu Pengetahuan Alam. Bogor: Institusi Pertanian Bogor.
- Stærk D, et al. 2002, *In Vitro Cytotoxic Activity of Phenanthroindolizidine Alkaloids from Cynanchum vincetoxicum and Tylophora tanakae Against Drug-sensitive and Multidrug-resistant Cancer Cells*. Journal of Natural Products. 65: 1299-1302. 10.1021/np0106384.
- Tao K, et al. 2008. *Imagable 4T1 Model for the Study of Late Stage Breast Cancer*. BMC Cancer, 8:228.
- Yang M, et al. 2011. *Interventional Treatmen for Elderly Advance Primary Liver Cancer by Brucea javanica Oil Emulsion*. Chinese Journal of Experimental Traditional Medicinal Formula. Article ID 268963. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/268963>
- Yerlikaya AI, Okur E, & Ulukaya E. 2012. *The p53-independent Induction of Apoptosis in Breast Cancer Cells in Response to Proteasome Inhibitor Bortezomib*. Tumour Biol. 5:1385-92. doi: 10.1007/s13277-012-0386-3.
- Zhang H, et al. 2011. *Seed oil of Brucea javanica Induces Apoptotic Death of Acute Myeloid Leukemia Cells via Both the Death Receptors & the Mitochondrial-Related Pathways*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. doi: 10.1155/2011/965016.