

Aktivitas Sitotoksik dan Ekspresi Protein p53 Bcl-2 Ekstrak dan Fraksi Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.) terhadap Sel Kanker Payudara T47D

Cytotoxicity and Expression of p53 Bcl-2 Protein of Extract and Fraction of Jamaican Cherry (*Muntingia calabura* L.) Leaves on T47D Breast Cancer Cells

Maulita Saraswati*, Nuraini Harmastuti, Wiwin Herdwiani

Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi
Jl. Letjen Sutoyo Mojosongo, Solo 57127, Indonesia

*Corresponding author email: maulita27@gmail.com

Received 29-4-2020

Accepted 15-8-2020

Available online 31-12-2020

ABSTRAK

Daun kersen (*Muntingia calabura* L.) merupakan tanaman yang dapat digunakan sebagai alternative pengobatan kanker. Penelitian ini bertujuan mengetahui aktivitas sitotoksik ekstrak etanol daun kersen, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air ekstrak daun kersen terhadap sel T47D dan mengetahui pengaruh ekspresi protein p53 dan Bcl-2 pada pemberian fraksi aktif daun kersen. Daun kersen diekstrak dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Ekstrak etanol kemudian difraksinasi dengan partisi cair-cair. Uji sitotoksik dilakukan pada sel kanker payudara T47D dan sel vero dengan metode MTT assay dan dibaca absorbansinya menggunakan ELISA reader. Untuk mengetahui pengaruh ekspresi protein p53 dan Bcl-2 dilakukan uji imunositokimia. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa fraksi n-heksan daun kersen memiliki aktivitas sitotoksik potensial terhadap sel kanker payudara T47D, sedangkan pada ekstrak, fraksi etil asetat, dan fraksi air memiliki aktivitas sitotoksik moderat. Fraksi n-heksan daun kersen mampu meningkatkan ekspresi protein p53 dan Bcl-2 pada konsentrasi 6,79 - 27,16 µg/mL.

Kata kunci: ekspresi p53 dan Bcl-2, *Muntingia calabura* L., sel T47D, sitotoksik.

ABSTRACT

Jamaican cherry (Muntingia calabura L.) leaves might be used for alternative cancer treatment. The aim of this study was to determine the cytotoxic activity of ethanol extract, as well as n-hexane, ethyl acetate, and water fractions of Jamaican cherry on T47D breast cancer cells and to the effect to the expression of p53 and Bcl-2. Extract was obtained through maceration method with ethanol 70% solvent. Ethanol extract was then fractionated with liquid-liquid partition. Cytotoxic tests were performed using T47D breast cancer cells and Vero cells with the MTT assay test method and the absorbance was read on ELISA reader. To determine the effect of expression of p53 and Bcl-2, an

immunocytochemistry test was carried out. The result showed that the n-hexane fraction of Jamaican cherry leaves has a potential cytotoxic activity against T47D breast cancer cells, while ethanol extract, ethyl acetate fraction, and water fraction has moderate cytotoxicity. The n-hexane fraction of Jamaican cherry leaves was able to increase the expression of p53 and Bcl-2 at concentration of 6.79-27.16 µg/mL.

Keywords: cytotoxic, *Muntingia calabura L.*, p53 and Bcl-2 expression, T47D cells.

Pendahuluan

Kanker payudara adalah kanker yang terjadi pada jaringan payudara dan umumnya diderita oleh wanita. Menurut data GLOBOCAN tahun 2018 (IARC, 2018: 1), diketahui bahwa kanker payudara merupakan penyebab kematian tertinggi kelima dengan kasus kematian sebanyak 626.679 atau 6,6% dari total kasus kematian akibat kanker. Dengan perkiraan 2.088.849 kasus baru yang didiagnosis pada tahun 2018 (11,6% dari semua jenis kanker).

Pengobatan kanker yang saat ini banyak digunakan menimbulkan efek samping dan resisten. Belum ditemukan obat kanker yang selektif sehingga aman dan penyembuhan yang maksimal, maka perlu dikembangkan obat baru bagi penderita kanker dari bahan alam. Salah satu tanaman yang dapat dikembangkan sebagai agen antikanker adalah kersen (*Muntingia calabura L.*). Dimana tanaman ini mudah didapatkan sehingga memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai agen antikanker.

Penelitian sebelumnya pada ekstrak daun kersen yang memiliki aktivitas antikanker antara lain dengan menggunakan metode BLST (*Brine Shrimp Lethality Test*) (Widiastuti dkk., 2016 dan Sadli, 2015), pada sel kanker

kolon secara in vitro (Jih-Jung, 2005 dan Sufian dkk.,2013), pada sel kanker payudara MCF7, sel kanker darah HL60 (Sufian dkk.,2013). Penelitian ini menggunakan sel kanker payudara T47D secara in vitro dikarenakan mudah penanganannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas atau pertumbuhannya cepat, homogenitas tinggi dan mudah diganti sel baru yang telah dibekukan jika terjadi kontaminasi (Abcam, 2007), Sel kanker payudara T47D mengekspresikan protein p53 yang termutasi, sehingga bagian respon elemen p53 tidak dapat berikatan dengan DNA, dan mengurangi atau menghilangkan kemampuan p53 dalam meregulasi siklus sel dan memacu apoptosis (Schafer dkk., 2000; Abcam, 2007).

Apoptosis juga melakukan proses aktif dengan menginduksi gen seperti BAX dan ekspresi antigen Fas maupun penekanan simultan gen seperti Bcl-2. Gen p53 berperan dalam mengatur siklus sel dengan mengontrol sejumlah gen termasuk gen untuk apoptosis jika mengalami kerusakan berat. Rekonsitusi jalur apoptosis oleh p53 dapat terjadi dengan mentransfer gen p53 wild type rekombinan pada sel

kanker payudara yang mengekspresi p53 mutan (Smith dkk., 1996).

Penelitian ini melakukan uji imunositokimia untuk mengetahui kemampuan ekstrak dan fraksi dalam menginduksi apoptosis dengan melihat tingkat ekspresi protein p53 dan Bcl-2.

Metode Penelitian

Alat

Alat terdiri dari oven, blender, ayakan no.40, timbangan analitik, *moustore balance*, corong, evaporator alat-alat gelas, botol maserasi, tangki nitrogen cair, *sentrifuge*, autoklaf, *sentrifuge* Sigma 3K12 (B, *Braun Biotech International*), *Laminar Air Flow class II* (Labconco), *ELISA reader* (SLT 240 ATC), *Nebauer Haemocytometer*, tabung konikal steril, mikropate 96 sumuran, lampu ultra violet, neraca elektrik, mikropipet 20-200 μ L dan 200-2000 μ L (pipetman), mesin *vortex*, mikroskop inverted (*Axiovert-25*), *tissue cultur flask* (Nunclone), inkubator 37° C (Merck), *magnetic stirrer* dan camera digital.

Bahan

Bahan sampel yang digunakan adalah ekstrak etanol dan fraksi etil asetat, air, n-heksan daun kersen. Bahan untuk uji sitotoksik dan imunositokimia: sel line T47D, sel Vero, protein p53 dan Bcl-2, media RPMI 1640 (media sel line T47D) (Gibco), natrium bikarbonat, HEPES (Sigma), *Fetal Bovine Serum* (FBS), penisilin-streptomisin 1% v/v (Gibco), DMSO (Dimetil Sulfoksida), Tripsin 0,5% MTT 5mg/ml, medium M119, larutan PBS, Fungsi 0,5% MTT 5 mg/ml, dalam PBS, media pencuci sel, larutan PBS

(*Phosphate Buffered Saline*) pH 7,2, Natrium Dodesil Sulfat 10% dalam HCl 0,1 N sebagai *stopper*.

Jalannya penelitian

1. Pembuatan serbuk simplisia daun kersen

Daun kersen dikumpulkan dan dicuci dengan air mengalir agar kotoran yang menempel pada daun dapat hilang, selanjutnya daun ditiriskan dan dipotong untuk memperkecil ukuran. Tahap berikutnya dilakukan pengeringan dengan oven pada suhu 40°C. Setelah daun kering, dibuat serbuk dengan blender dan selanjutnya diayak dengan ayakan nomor 40, lalu dihitung presentase bobot kering terhadap bobot basah.

2. Pembuatan ekstrak etanol 70% daun kersen dengan metode maserasi

Metode maserasi yaitu merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari dengan perbandingan 10 bagian simplisia daun kersen (400g) dimasukkan dalam toples kaca, kemudian dituangi 75 bagian pelarut etanol (3000ml) ditutup rapat, proses penyarian dilakukan selama 5 hari. Selama proses maserasi setiap hari harus dikocok. Setelah 5 hari perendaman, diperoleh ampas dan filtrat (ekstrak cair). Ampas yang diperoleh ditambah cairan penyari secukupnya diaduk dan disaring sehingga diperoleh seluruh sari. Filtrat kemudian diuapkan menggunakan evaporator (suhu tetap dijaga pada suhu 40°C-50°C) sampai diperoleh ekstrak kental.

3. Pembuatan fraksi ekstrak etanol 70% daun kersen

Fraksinasi dilakukan dengan metode fraksinasi cair-cair dengan corong pisah. Setiap tahap fraksinasi dilakukan terhadap 10 gram ekstrak. Pertama ekstrak ditimbang sebanyak 10 gram lalu dilarutkan dengan sedikit air panas, kemudian dipartisi dengan air 100 ml dan pelarut n-heksan 100 ml ke dalam corong pisah diulang sebanyak 3 kali. Fraksi n-heksan dipisahkan dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C. Fraksi air sisa dari fraksi n-heksan difraksinasi kembali dengan pelarut etil asetat 100 ml menggunakan corong pisah diulang sebanyak 3 kali. Fraksi etil asetat dipisahkan dari fraksi air kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator dengan suhu penangas 50°C. Filtrat sisa fraksinasi dengan etil asetat adalah fraksi air, yang kemudian dikentalkan dengan penangan air sampai kental.

4. Identifikasi senyawa daun kersen

Larutan ekstrak dan fraksi yang telah dilarutkan, ditotolkan dengan plat silika gel GF254 sebagai fase diam. Sistem fase gerak dan pereaksi semprot disesuaikan dengan masing-masing senyawa kimia yang akan diidentifikasi.

5. Uji sitotoksik metode MTT

Pengujian dilakukan terhadap sel kanker payudara T47D dan sel Vero. Sel kanker payudara T47D ditumbuhkan dalam media kultur RPMI 1640, sedangkan sel vero

ditumbuhkan dalam media kultur M199. Setelah sel dikultur pada media lalu diinkubasi dalam incubator CO₂ pada suhu 37°C. Selanjutnya dilakukan pencucian menggunakan PBS yang bertujuan untuk menghilangkan sel-sel yang tidak sehat serta menghilangkan serum dalam media yang tertinggal. Proses penambahan tripsin dan inkubasi selama 5 menit bertujuan untuk membiarkan sel berpenetrasi dengan tripsin yang berfungsi sebagai enzim protease yang melepaskan interaksi antara molekul glikoprotein dan peroteoglikan dengan permukaan flask. Akibatnya sel akan kehilangan kemampuan untuk melekat pada permukaan flask dan terlihat mengapung (Doyle dkk, 2000). Seri konsentrasi yang digunakan dalam uji sitotoksik yaitu 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,81 µg/mL dengan tiga kali replikasi. Masing-masing sampel yang telah ditimbang sebanyak 10 mg dilarutkan dengan DMSO. Hasil uji sitotoksik ekstrak dan fraksi-fraksi daun kersen dapat diamati melalui pengamatan morfologi sel yang dilakukan dibawah mikroskop. Penentuan IC₅₀ dilakukan berdasarkan grafik dan perhitungan persamaan linier.

6. Indeks selektivitas

Selektivitas ekstrak dan fraksi pada tanaman menggunakan parameter Selektivitas Index (SI). Uji selektivitas digunakan sebagai indikasi selektivitas sitotoksik (tingkat keamanan) dari ekstrak terhadap sel

normal(vero), yakni toksik terhadap sel kanker namun tidak toksik terhadap sel normal. Suatu ekstrak dikatakan memiliki selektivitas tinggi apabila nilai $SI \geq 3$, dan dikatakan kurang selektif apabila nilai $SI < 3$. Semakin besar angka indeks selektivitas obat antikanker yang ada saat ini, artinya efek samping yang ditimbulkan cukup banyak, menyebabkan penderita kanker banyak yang menghentikan kemoterapi.

7. Uji imunositokimia

Kultur sel sebanyak 5×10^4 sel/sumuran ditransfer ke dalam 24-well plate yang telah diisi dengan cover slip kemudian sel diinkubasi semalam pada suhu 37°C dalam inkubator CO_2 5 %. Setelah sel pulih kembali, diberi perlakuan ekstrak dan diinkubasi kembali selama 15 jam. Pada akhir waktu inkubasi, sel dicuci PBS kemudian ditambahkan metanol dingin dan diinkubasi di dalam freezer -4°C selama 10 menit. Sel yang telah difiksasi kemudian dicuci dengan aquades 2 kali kemudian diinkubasi dalam larutan hydrogen peroksidase selama 10 menit. Selanjutnya, sel ditetesi dengan prediluted blocking serum dan diinkubasi 10 menit. Kemudian ditetesi dengan Antibodi primer anti p53 dan Bcl-2 (pengenceran 1:50), diinkubasi selama 10 menit, dan dicuci dalam PBS sebanyak 3 kali. Preparat diinkubasi dalam biotin selama 10 menit dan dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali selama 5 menit.

Setelah dicuci dengan PBS, sel ditetesi dengan antibodi sekunder (biotinylated universal secondary antibody) dan diinkubasi kembali selama 10 menit. Kemudian preparat diinkubasi dalam streptavidin-peroksidase selama 10 menit dan dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali selama 5 menit. Selanjutnya, preparat dicuci kembali dengan PBS lalu diinkubasi dalam DAB selama 10 menit dan dicuci dengan aquades. Preparat kemudian direndam dalam larutan Mayer-Haematoxylin selama 3-4 menit untuk counterstain dan dicuci dengan aquades. Cover slip kemudian diangkat dandicelupkan ke dalam xylol, kemudian dicelupkan ke dalam alkohol. Setelah kering, cover slip diletakkan di atas kaca obyek dan ditetesi dengan lem (mounting media). Cover slip ditutup dengan slide kemudian dilakukan pengamatan dengan mikroskop cahaya.

Hasil dan Pembahasan

Hasil ekstrak etanol 70% pada daun kersen didapatkan rendemen terhadap simplisia yang diekstraksi sebesar 20,8%. Hasil rendemen dari fraksi n-heksan, etil asetat, dan fraksi air berturut-turut sebesar 5,4; 8,4; dan 19,5%. Penapisan fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa yang terkandung dalam ekstrak dan fraksi. Senyawa yang diidentifikasi antara lain flavonoid, alkaloid, dan terpenoid. Penapisan fitokimia dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT)

menggunakan fase diam silica gel GF₂₅₄ dan berbagai macam fase gerak. Pemisahan terjadi pada KLT berdasarkan pada mekanisme adsorpsi dan partisi. Tujuan dilakukan uji penapisan fitokimia dengan metode KLT lebih banyak digunakan untuk tujuan pemisahan, namun juga digunakan untuk tujuan identifikasi karena KLT relative mudah, sederhana, dan memberikan pilihan fase gerak yang beragam (Hanani, 2014).

Hasil pemeriksaan kandungan kimia ekstrak dan fraksi dapat dilihat pada Tabel 1. Berdasarkan hasil yang diperoleh ekstrak dan fraksi daun kersen mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, dan terpenoid.

Uji sitotoksik dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui ketoksikan ekstrak dan fraksi dari daun kersen terhadap sel kanker payudara T47D dan

selektif terhadap sel Vero. Aktivitas sitotoksik dapat diketahui dengan nilai IC₅₀ dimana nilai IC₅₀ berdasarkan nilai konsentrasi yang dihasilkan dari hambatan 50% sel dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel kanker.

Pengujian dilakukan terhadap sel kanker payudara T47D dan sel Vero. Sel kanker payudara T47D ditumbuhkan dalam media kultur RPMI 1640, sedangkan sel vero ditumbuhkan dalam media kultur M199.

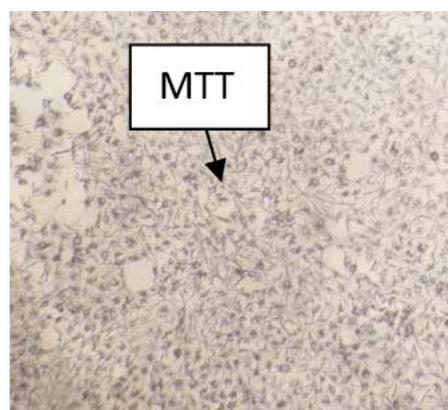
Perbedaan sel hidup dan sel mati akan terlihat jelas setelah pemberian garam MTT. Sel yang hidup akan membentuk Kristal formazan berwarna ungu seperti yang terlihat pada Gambar 1.

Tabel 1. Kandungan kimia ekstrak dan fraksi daun kersen

Sampel	Kandungan kimia		
	Flavonoid	Alkaloid	Terpenoid
Ekstrak etanol	+	+	+
Fraksi n-heksan	+	+	+
Fraksi etil asetat	+	+	+



(a)



(b)

Gambar 1. Morfologi sel T47D (a) sebelum perlakuan MTT (b) setelah perlakuan MTT

Nilai IC_{50} dihitung masing-masing pada sel T47D dan sel vero dengan menggunakan persamaan $y = a+bx$ untuk menentukan konsentrasi yang menyebabkan hambatan pertumbuhan sel hingga 50%. Harga IC_{50} diperoleh dari antilog nilai x dari persamaan tersebut setelah diperoleh nilai intersep. Nilai IC_{50} masing-masing sampel dapat dilihat pada Gambar 2.

Nilai IC_{50} menunjukkan bahwa nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel kanker. Menurut Prayong, dkk. (2008) sitotoksitas dapat dikelompokkan menjadi tiga yaitu: (1) sitotoksik potensial jika $IC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$, (2) sitotoksik moderat jika $100 \mu\text{g/ml} < IC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$, dan (3) tidak toksik jika $IC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$.

Berdasarkan hasil penelitian sampel ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun kersen bersifat sitotoksik moderat. Sitotoksitas moderat dapat dimanfaatkan untuk kemoprevensi yang dapat mencegah dan menghambat pertumbuhan sel kanker. Sedangkan pada fraksi n-heksan memiliki nilai $IC_{50} < 100$ dimana kelompok tersebut memiliki potensial sebagai agen antikanker payudara sel T47D. Sampel yang memiliki potensi sebagai antikanker adalah fraksi n-heksan, kemungkinan hal ini disebabkan pada ekstrak etanol daun kersen masih terdapat senyawa polar, nonpolar, maupun semipolar yang kompleks sehingga kandungan senyawa

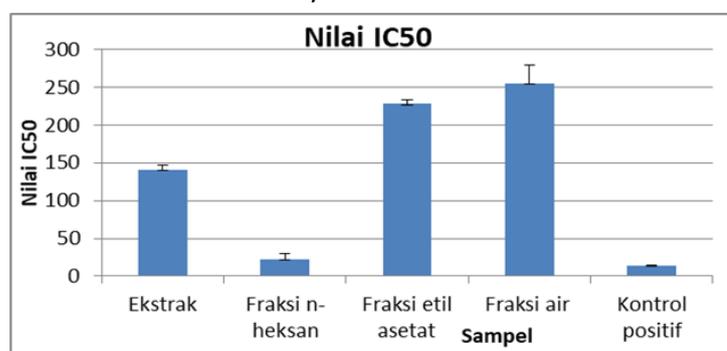
yang memiliki efek sitotoksik lebih kecil dibanding fraksi n-heksan dan senyawa kompleks tersebut menyebabkan efek toksiknya saling mempengaruhi (Djajanegara dan Wahyudi, 2009).

Berdasarkan skrining fitokimia fraksi n-heksan daun kersen positif mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, terpenoid. Mekanisme flavonoid menginduksi apoptosis melalui penghambatan aktivitas topoisomerase I/II, memodulasi pensinyalan, penurunan ekspresi gen Bcl-2 dan Bcl-XL, peningkatan ekspresi gen Bax, Bak, dan p53, serta aktivasi endonuclease (Ren W dkk, 2003). Pada proses siklus sel alkaloid berikatan dengan tubulin yaitu suatu protein yang menyusun mikrotubulus. Terikatnya tubulin pada alkaloid mengakibatkan polimerisasi protein menjadi mikrotubulus akan terhambat sehingga pembentukan spindle mitotik akan terhambat pula dan siklus sel akan terhenti pada metafase. Karena tidak dapat melakukan pembelahan sel, sel tersebut kemudian akan mengalami apoptosis (Bertomi, 2011). Senyawa alkaloid akan menghambat sel kanker T47D pada fase G1 dengan meningkatkan p53 yang merupakan protein penghambat sel kanker (Asmuddin, 2004). Senyawa triterpenoid mampu menginduksi kalsium (Ca^{+}) yang dapat menstimulasi apoptosis sel kanker. Triterpenoid mampu memblokir siklus sel pada fase G2/M dengan menstabilkan benang-benang sponde pada fase mitosis sehingga menyebabkan proses mitosis

terhambat (Pan et al. 2007). Pada tahap selanjutnya, terjadi penghambatan proliferasi sel dan pemacuan apoptosis. Ada dua kelas enzim topoisomerase pada mamalia, tipe I yang memotong dan memecah untai tunggal dari DNA dan tipe II yang memotong dan memecah DNA untai ganda. Inhibitor enzim topoisomerase akan menstabilkan kompleks topoisomerase dan DNA terpotong, sehingga dapat menyebabkan terjadinya kerusakan DNA. Adanya

kerusakan DNA menyebabkan terekspresinya protein proapoptosis sehingga dapat memacu terjadinya apoptosis (Setiawati dkk., 2007).

Ekstrak dan fraksi yang memiliki sifat sitotoksik terhadap sel kanker juga harus memiliki selektivitas terhadap sel kanker maupun sel normal. Fraksi juga diuji sitotoksik terhadap sel vero. Nilai dari IC₅₀ sel vero dapat dilihat pada Tabel 3.



Gambar 2. Grafik nilai IC₅₀ sel kanker payudara T47D

Tabel 3. Hasil IC₅₀ sel vero

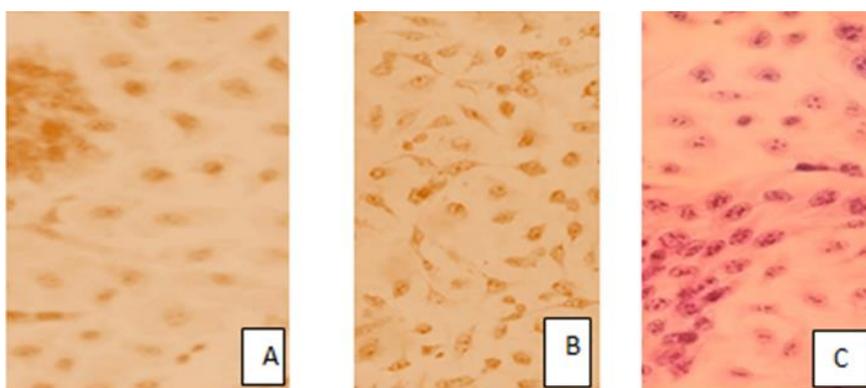
Sampel	Persamaan Garis (r)	IC ₅₀
Ekstrak etanol	1. $y = -18,21x + 95,83$ (r=0,96)	329,24
	2. $y = -17,23x + 92,16$ (r=0,95)	279,08
	3. $y = -20,12x + 100,26$ (r=0,99)	314,24
	Rata-rata ± SD	307,52 ± 25,74
Fraksi n-heksan	1. $y = -51,67x + 142,87$ (r=0,98)	62,67
	2. $y = -48,26x + 137,99$ (r=0,97)	66,56
	3. $y = -48,69x + 141,77$ (r=0,98)	76,66
	Rata-rata ± SD	68,63 ± 7,21
Fraksi etil asetat	1. $y = -33,45x + 134,80$ (r=0,987)	342,39
	2. $y = -37,73x + 144,61$ (r=0,93)	321,62
	3. $y = -35,21x + 141,14$ (r=0,92)	352,21
	Rata-rata ± SD	338,74 ± 15,61
Fraksi air	1. $y = -24,53x + 113,11$ (r=0,97)	373,18
	2. $y = -25,31x + 114,70$ (r=0,93)	359,66
	3. $y = -25,67x + 116,48$ (r=0,93)	388,95
	Rata-rata ± SD	373,93 ± 24,94
Kontrol positif	1. $y = -10,63x + 70,43$ (r=0,98)	83,77
	2. $y = -13,29x + 73,71$ (r=0,97)	60,69
	3. $y = -8,57x + 66,56$ (r=0,99)	85,38

Sampel	Persamaan Garis (r)	IC ₅₀
	Rata-rata ± SD	76,61 ± 13,81
<p>Indeks selektivitas menunjukkan selektivitas sitotoksik (keamanan) dari ekstrak terhadap sel kanker T47D versus sel normal (sel vero), yang dihitung dengan membandingkan IC₅₀ ekstrak dan fraksi daun kersen terhadap sel normal dengan IC₅₀ ekstrak dan fraksi daun kersen terhadap sel kanker payudara T47D. Suatu sampel dikatakan bersifat selektif apabila mempunyai indeks selektivitas > 3 sehingga dapat dilihat pada Gambar 3 bahwa fraksi n-heksan daun kersen memiliki indeks selektivitas >3. Dari data hasil dapat diketahui bahwa yang memiliki indeks selektivitas yang memenuhi syarat adalah fraksi n-heksan. Dimana data indeks selektivitas tersebut digunakan acuan untuk melanjutkan uji imunositokimia, sehingga sampel yang memenuhi syarat untuk dilanjutkan uji imunositokimia adalah fraksi n-heksan.</p> <p>Imunositokimia merupakan metode untuk mendeteksi adanya ekspresi suatu protein spesifik dan antigen dalam sel dengan menggunakan antibody spesifik yang akan berikatan dengan protein atau antigen. Pengujian dilakukan pada tiga kelompok perlakuan yaitu kelompok tanpa perlakuan (kontrol sel), kelompok dengan pemberian fraksi n-heksan daun kersen dan masing-masing dengan konsentrasi hasil dari nilai ½ IC₅₀ (6,79 µg/ml) IC₅₀ (13,58 µg/ml) 2IC₅₀ (27,16 µg/ml). Ekspresi p53 dan Bcl-2 ditunjukkan dengan adanya ikatan antara protein dengan antibodi monoklonal anti p53 atau Bcl-2 yang</p>	<p>terdeteksi berupa warna coklat pada sitoplasma dan membran sel T47D. Analisis data dengan software ImageJ dilakukan untuk menghitung ekspresi protein p53 dan Bcl-2 secara kuantitatif dengan menghitung jumlah pixel threshold (area) serta persentase pixel threshold (% area). Hasil pengecatan imunositokimia sel T47D untuk melihat ekspresi p53 dapat dilihat pada Gambar 3 dan Gambar 4 ekspresi bcl-2.</p> <p>Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa fraksi n-heksan dapat meningkatkan ekspresi p53 pada sel T47D. Semakin besar konsentrasi dari fraksi n-heksana maka ekspresi p53 pada sel T47D semakin tinggi. Gen p53 merupakan tumor supresor gen yang terakumulasi bila DNA mengalami kerusakan. Fungsi p53 mencegah replikasi sel pada sel yang rusak secara genetic dengan penghentian siklus sel pada fase G1 atau interfase, sehingga sel mempunyai waktu repair. Terjadinya mutasi pada gen p53 mengakibatkan disregulasi gen sehingga terjadi kegagalan apoptosis dan sel yang rusak mengalami replikasi dan akhirnya terjadi kanker. Protein p53 memiliki aktivitas biokimia sebagai faktor transkripsi dan peran biologi sebagai tumor suppressor yang sangat kuat. Sebagai faktor transkripsi multitarget, p53 mengontrol berbagai jenis gen dengan fungsi yang berbeda-beda. Sebagai penekan tumor, p53 sangat penting untuk mencegah proliferasi sel yang menyimpang serta</p>	

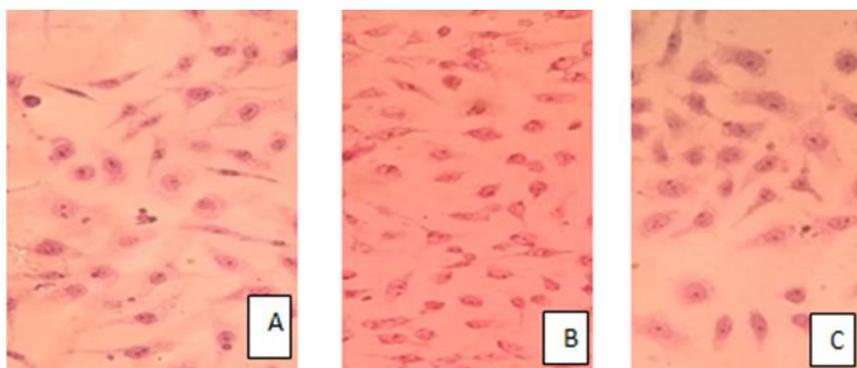
mempertahankan integritas genom akibat stress genotoksik (Foulkes, 2007).

Tabel 4. Hasil indeks selektivitas

Sampel	IC ₅₀ sel vero (a)	IC ₅₀ sel T47D (b)	IS (a:b)
Ekstrak etanol	459,53	321,84	1,43
Fraksi n-heksan	68,64	13,59	5,05
Fraksi etil asetat	338,74	165,28	2,05
Fraksi air	866,79	419,82	2,06
Kontrol Positif	67,58	14,80	4,57



Gambar 3. Hasil pengamatan ekspresi gen p53. (A) konsentrasi fraksi n-heksan 6,792 µg/ml, (B) konsentrasi control positif 14,084 µg/ml, (C) Kontrol sel tanpa perlakuan. Pengamatan di bawah mikroskop cahaya



Gambar 4. Hasil pengamatan ekspresi gen Bcl-2 (A) fraksi n-heksana daun kersen dengan konsentrasi 6,79 µg/ml, (B) kontrol positif, (C) Kontrol sel tanpa perlakuan. Pengamatan di bawah mikroskop cahaya

Tabel 5. Hasil peningkatan ekspresi p53

Perlakuan	Konsentrasi (µg/ml)	Ekspresi p53 (%)	Peningkatan ekspresi p53	EC ₅₀
Fraksi n-heksan	6,792 (1/2 IC ₅₀)	6,46±0,38	170,85±16,17	5,38±0,247
	13,585 (IC ₅₀)	11,30±0,91	373,90±38,47	
	27,170 (2 IC ₅₀)	19,89±0,99	734,10±41,53	
Kontrol positif	12,554 (IC ₅₀)	9,92±1,63	-	-
	25,108 (2 IC ₅₀)	11,52±2,32	-	-

Kontrol sel - 2,385±1,4 - -

Tabel 6. Hasil penghambatan ekspresi Bcl-2

Perlakuan	Konsentrasi (µg/ml)	Ekspresi Bcl-2 (%)	Peghambatan ekspresi Bcl-2	EC ₅₀
Fraksi n-heksan	6,792 (1/2 IC ₅₀)	12,46±1,75	33,73±9,34	10,54±1,81
	13,585 (IC ₅₀)	7,26±0,17	61,39±0,91	
	27,170 (2 IC ₅₀)	4,43±0,29	76,41±1,58	
Kontrol positif	12,554 (IC ₅₀)	12,322±1,63	-	-
	25,108 (2 IC ₅₀)	17,926±4,01	-	-
Kontrol sel	0	18,81	-	-

Selain menyebabkan aktivasi transkripsional secara langsung maupun tidak langsung, peningkatan kadar p53 juga menyebabkan represi terhadap berbagai ekspresi gen. Gen yang mungkin dapat ditekan dengan p53 termasuk Bcl-2, Bcl-X1, cyclin B1, MAP4 dan survivin, beberapa dari mereka adalah regulator negatif terhadap apoptosis. Dimana gen Bcl-2 memiliki peran melindungi tumor sel dari proses apoptosis sehingga memungkinkan sel

untuk terus tumbuh. Pada penelitian ini ekspresi fraksi n-heksan dapat menurunkan ekspresi Bcl-2 ditunjukkan dengan adanya ikatan antara protein Bcl-2 dengan antibody monoklonal anti Bcl-2 yang terdeteksi berupa warna coklat pada sitoplasma dan membrane sel T47D. Berdasarkan Tabel 13 fraksi n-heksan mampu menurunkan ekspresi Bcl-2 sehingga dapat digunakan sebagai agen antikanker.

Kesimpulan

Ekstrak dan fraksi daun kersen memiliki aktivitas sitotoksik. Ekstrak etanol, fraksi etanol, dan fraksi air menunjukkan aktivitas moderat, sedangkan fraksi n-heksan menunjukkan aktivitas sitotoksik yang poten. Fraksi n-heksan daun kersen mampu mempengaruhi ekspresi protein p53 dan bcl-2. Senyawa kimia yang terdapat dalam ekstrak etanolik dan fraksi daun kersen antara lain flavonoid, alkaloid, dan terpenoid. Indeks selektivitas ekstrak, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air, dan kontrol positif terhadap sel kanker payudara T47D dan sel vero masing-masing sebesar 1,75; 5,47; 2,33; 1,87; dan 5,38.

Daftar Pustaka

- Abcam, 2007, T47D (Human ductal breast epithelial tumor cell line) Whole Cell Lysate (ab14899) <http://www.abcam.com/index.html?datasheet=14899>, diakses tanggal 30 Juni 2019.
- Bertomi R. P., 2011, Uji Toksisitas Akut Ekstrak Kulit Batang Pulasari (*Alyxiae cortex*) dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BST), Skripsi Sarjana, Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta, h. 6.
- Djajanegara I., & Prio Wahyudi, 2009, Pemakaian Sel HeLa dalam Uji Sitotoksitas Fraksi Kloroform dan Etanol Ekstrak Daun *Annona*

- squamosa*, Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia. 7(11): 1693-1831.
- Doyle, A., Griffith, S .J. B., 2000, Cell and Tissue Culture for Medical Research, 49, John Willey and Sons, Ltd., New York.
- Hanani E. Analisis Fitokimia. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran ECG; 2014.
- Jih-Jung C., Hsinn-Hsing L., Chang-Yih D., Ih-Sheng C. 2005. Cytotoxic Chalcones and Flavonoids from the Leaves of *Muntingia calabura*. *Planta Medica*. 71(10): 970-973.
- Pan, M.H., Chen, W.J., Lin-Shiau, S., Ho, C.H., and Lin, J.K., 2002, Tangeretin Induces Cell-Cycle Through Inhibiting Cyclin-Dependent Kinase 2 & 4 Activities As Well As Elevating Cdk Inhibitor p21 in Human Colorectal Carcinoma Cells, *Carcinogenesis*, Oxford University Press, 23: 1677-1684.
- Prayong P, Barusrux S, dan Weerapreeyakul N. 2008. Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. *Fitoterapia*. 79: 598-601
- Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. 2003. Flavonoids: promising anticancer agents. *Med Res Rev*. 23(4): 519-34.
- Sadli, Nurul W.U., Irma S. 2015. The Cytotoxic Activity of Ethylacetatefraction of Kersen (*Muntingia calabura*) Leaves Against Larve Shrimp *Artemia Salina* Leach. *Jurnal Natural*. 15(2): .
- Schafer, J.M., Lee, E.S., O'Regan, R.M., Yao, K. & Jordan, V.C. 2000. Rapid Development of Tamoxifen-Stimulated Mutant p53 Breast Tumors (T47D) in Athymic Mice. *Clinical Cancer Research*. 6(11): 4373-4380.
- Smith ML, Fornace AJ, Jr. 1996. Mammalian DNA damage-inducible genes associated with growth arraset and apoptosis. *Mutation Research*. 340: 109-124
- Sufian, A. S., Ramasamy, K., Ahmat, N., Zakaria, Z. A., & Yusof, M. I. M. (2013). Isolation and identification of antibacterial and cytotoxic compounds from the leaves of *Muntingia calabura* L. *Journal of Ethnopharmacology*. 146(1): 198-204.
- Widiastuti A.E.S., Muhammad Agung S.C. 2016. Kandungan Kimia Dan Uji Aktivitas Toksik Menggunakan Metode BSLT (Brine Shrimp Lethality Test) Dari Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia calabura*). *Jurnal Kimia dan Pendidikan Kimia (JKPK)*. 1(2): .