



## Cytotoxic Activity and Phytochemical Analysis of *Breynia cernua* from Papua

Septriyanto Dirgantara<sup>1\*</sup>, Rosye H.R. Tanjung<sup>2</sup>, Hendra K. Maury<sup>2</sup>, Edy Meiyanto<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,  
Universitas Cenderawasih, Jayapura, Papua

<sup>2</sup>Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,  
Universitas Cenderawasih, Jayapura, Papua

<sup>3</sup>Cancer Chemopreventive Research Center (CCRC), Fakultas Farmasi,  
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Submitted 16 October 2017; Revised 07 November 2017; Accepted 13 November 2017; Published 24 March 2018

\*Corresponding author: septriyanto198@gmail.com

### Abstract

*Breynia cernua* (local name Katuk Hutan) is an Indonesian medicinal plant (family: Euphorbiaceae) originated from Papua which have been used traditionally as alternative treatment for breast and cervical cancer. The objectives of this research were to investigate potential cytotoxic activity and phytochemical aspect test of *B. cernua* extract and its fractions. Extraction was performed by maceration using ethanol 96%, followed by successive fractionations. Phytochemical screening and in vitro cytotoxic activity test were obtained for extract and active fraction with Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) method and MCF-7 tumor cell lines were assessed by 3-(4-5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. The results from cytotoxic activity test of breast cancer MCF-7 cell line from ethanolic 96% extract and three fractions: n-hexane, ethylacetate and water fractions showed 246.841 ppm, 165.65 ppm, 562.57 ppm dan 713.78 ppm respectively meanwhile the IC<sub>50</sub> value of doxorubicin as the positive control was 6 µM. TLC and phytochemical screening showed the presence of alkaloids, terpenoid, flavonoids and tannins compounds in this active plant.

**Keywords:** Antitumor, *Breynia cernua*, BSLT, MCF-7

## Aktivitas Sitotoksik dan Analisis Fitokimia dari Tumbuhan *Breynia cernua* Asal Papua

### Abstrak

*Breynia cernia* (nama lokal Katuk Hutan) adalah salah satu tumbuhan obat Indonesia (famili: Euphorbiaceae) yang berasal dari Papua dan telah digunakan secara tradisional sebagai pengobatan alternatif untuk mengobati kanker payudara dan kanker serviks. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi aktivitas sitotoksik dan analisis fitokimia ekstrak *B. cernua* dan fraksinya. Ekstraksi dilakukan secara maserasi dengan etanol 96%, selanjutnya dilakukan fraksionasi. Skrining fitokimia dan uji aktivitas sitotoksik secara *in vitro* dari ekstrak dan fraksi dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dan metode 3-(4-5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) terhadap sel kanker MCF-7. Hasil pengujian sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 dari ekstrak etanol 96% dan ketiga fraksi yaitu fraksi n-heksana, etilasetat dan air berturut-turut menghasilkan nilai IC<sub>50</sub> yaitu 246,841 ppm, 165,65 ppm, 562,57 ppm dan 713,78 ppm sedangkan doxorubisin sebagai kontrol pembanding mempunyai nilai IC<sub>50</sub> sebesar 6 µM. Analisis KLT dan kromatografi kolom menunjukkan adanya golongan senyawa alkaloid, saponin, terpenoid, flavonoid dan tanin.

**Kata kunci:** Antitumor, *Breynia cernua*, BSLT, MCF-7

## 1. Pendahuluan

Penduduk Indonesia terdiri atas berbagai suku bangsa yang memiliki keanekaragaman budaya kearifan lokal dan tradisional mengenai pengetahuan tumbuhan obat serta cara penggunaan dalam menyembuhkan suatu penyakit sehingga menjadi cikal bakal penemuan obat baru yang berasal dari alam<sup>1</sup>. Kanker merupakan penyakit berbahaya yang ditandai dengan proliferasi sel yang tidak terkontrol serta abnormal. Penyakit kanker menempati peringkat kedua setelah kardiovaskular yang dapat menyebabkan kematian di negara maju seperti Amerika Serikat<sup>2</sup>. Meskipun belum ada data yang pasti di Indonesia, tetapi data dari berbagai laporan terdapat kenaikan jumlah kasus, data dari Riskesdas 2013 menunjukkan angka 1,4 per 1000 penduduk<sup>3</sup>.

*Breynia cernua* dengan nama lokal katuk hutan merupakan tanaman yang termasuk ke dalam famili Euphorbiaceae yang telah digunakan secara alternatif oleh masyarakat Papua khususnya di daerah Jayapura dan Timika untuk mengobati penyakit kanker payudara dan kanker leher rahim. Pada penelitian sebelumnya mengenai tanaman ini sangat terbatas yaitu penelitian tanaman sugisugi (*B. cernua*) asal Amuntai Kalimantan Selatan mengenai kajian farmakognostik dan skrining fitokimia ditemukan adanya golongan senyawa saponin, flavonoid dan kuinon<sup>4</sup>. Penelitian tentang uji aktivitas antibakteri dan antijamur daun, kulit batang dan akar *B. cernua* menunjukkan adanya perbedaan aktivitas dengan berbagai jenis pelarut ekstraksi<sup>5</sup>.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas sitotoksik ekstrak dan fraksi *B. cernua* terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dan sel kanker payudara MCF-7 secara *in vitro*. Hal ini memberikan makna dalam pencarian aktif sebagai suatu agen antikanker dari alam.

## 2. Metode

### 2.1. Alat

Alat-alat gelas, flakon, timbangan analitik (Shimazu, tipe LS-6DT), *Rotary*

*Vacuum Evaporator* (Heidolph WB 2000), akuarium, aluminium foil (Klin Pak), kain kasa (HK), plastik *seal*, sarung tangan (Medi Glove M dan B. Braun S), masker (One Med), inkubator thermostat (Heraccus), *Laminar Air Flow Hood* (LAF), bunsen, mikroskop (Olympus), *tissue culture flask* (Nunclon), tabung konikal (Nunclon), botol Durant (Nunclon), 96 *well-plate* (Iwaki), mikropipet (Gilson), *yellow tip*, *blue tip*, hemocytometer (Nebaur), *cell counter*, *Microplate reader* (Anthos 2001, COM1), *shaker*, autoklaf, filter Whatman 0,2  $\mu\text{m}$  (Sartorius), vortex, eppendorf tube dan lampu UV 254 dan 365 nm.

### 2.2. Bahan

Tanaman *B. cernua* asal Kota Jayapura, Etanol 96% teknis, n-heksana, etilasetat dan aquadest (Bratachem), telur *A. salina* (Supreme plus), Sel MCF-7 (CCRC UGM), DMEM yang mengandung *Foetal Bovine Serum* (FBS) 10% v/v (Gibco), doxorubisin (CCRC UGM), DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*) (Sigma), trypsin-EDTA (Gibco), aquadest (Asia Lab), PBS, MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolium bromida] (Sigma), Pelat KLT F254 (Merck).

### 2.3. Prosedur

#### 2.3.1. Pembuatan Ekstrak dan Fraksi *B.*

##### *cernua*

Daun segar *B. cernua* sebanyak 1 kg dikumpulkan dari Kota Jayapura, Papua. Daun segar disortasi, dicuci bersih, dipotong-potong dan dikeringkan dalam oven dengan suhu 70°C. Simplisia yang telah kering menjadi serbuk, kemudian diekstraksi dengan metode maserasi dengan penyari etanol 96%. Ekstrak etanol cair yang didapat dikentalkan dengan rotary evaporator dan dikeringkan diatas waterbath. Ekstrak etanol 96% selanjutnya difraksinasi dengan mengencerkan ekstrak pekat dengan (etanol 96%: aquadest = 1:1) dengan pelarut yang berbeda kepolarannya berturut-turut yaitu n-heksana, etilasetat dan aquadest. Skrining fitokimia dilakukan untuk mendeteksi adanya golongan senyawa berdasarkan metode Farnsworth<sup>6</sup>.

### 2.3.2. Uji Aktivitas Sitotoksik *Artemia salina* Metode BSLT.

Perlakuan uji sitotoksik dilakukan sebanyak 5 kali ulangan pada ekstrak etanol 96%. Penyiapan larva *A. salina* dengan menetasakan telur *A. salina* selama 48 jam sebelum dilakukan uji. Kemudian dibuat larutan induk yaitu dengan cara mencampurkan 100 mg ekstrak etanol 96% dengan 100 mL pelarut *aquadest* sehingga menghasilkan konsentrasi induk 1000 ppm selanjutnya dilakukan seri pengenceran konsentrasi 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750 ppm. Sebagai kontrol digunakan air laut kemudian dimasukkan 10 ekor larva *A. salina*. Pengamatan dilakukan selama 24 jam dengan menghitung jumlah kematian larva. Analisa dilakukan terhadap prosentase jumlah kematian larva udang dengan mencari nilai  $LC_{50}$  dengan analisa probit.

### 2.3.3. Uji Aktivitas Sitotoksik pada Sel Kanker Payudara (MCF-7)

Sel MCF-7 ditanam pada *microplate* 96 *well* sehingga diperoleh kepadatan  $5 \times 10^3$  sel/*well* dan diinkubasi selama 48 jam untuk mendapatkan pertumbuhan yang baik. Setelah itu medium diganti dengan yang baru kemudian ditambahkan ekstrak dan ketiga fraksi dengan *co-solvent* DMSO dengan konsentrasi 10, 20, 50, 75, 100, 250 dan 500 ppm serta diinkubasi pada 37°C dalam inkubator  $CO_2$  5% selama 48 jam. Pada akhir inkubasi, media dan ekstrak dibuang kemudian sel dicuci dengan PBS. Pada masing-masing sumuran, ditambahkan 100  $\mu$ L media kultur dan 10  $\mu$ L MTT 5 mg/mL. Sel diinkubasi kembali selama 4-6

jam dalam inkubator  $CO_2$  5%, 37°C. Reaksi MTT dihentikan dengan HCl 4N-isopropanol (1:100), digoyang di atas *shaker* selama 10 menit. Serapan dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm dan dibandingkan terhadap nilai  $IC_{50}$  doxorubisin sebagai kontrol positif<sup>7</sup>.

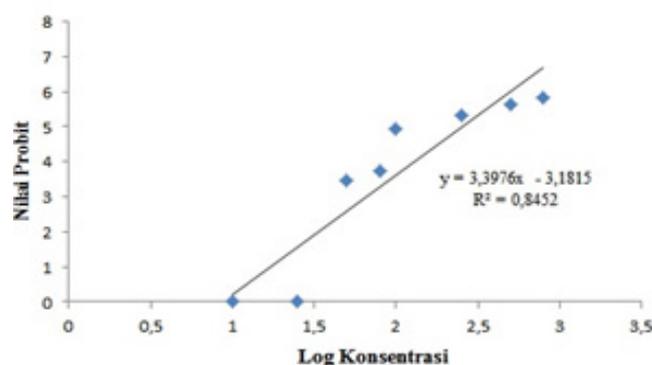
## 3. Hasil

Uji aktivitas sitotoksik metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) digunakan sebagai pengujian awal aktivitas antikanker dari bahan alam. Hasil uji sitotoksik larva *A. salina* dengan konsentrasi ekstrak etanol 96% *B. cernua* dapat dilihat pada Gambar 1.

Berdasarkan Gambar 1, menunjukkan grafik hubungan antara peningkatan kadar konsentrasi ekstrak etanol 96% terhadap kematian larva yang dianalisa dengan analisa persamaan garis linear probit log dengan persamaan  $y = 3,3976x - 3,1815$ . Parameter  $LC_{50}$  adalah nilai yang menunjukkan kemampuan konsentrasi yang dapat mematikan 50% populasi larva udang.

Nilai  $LC_{50}$  didapatkan dengan cara memasukkan nilai  $y = 5$  ke dalam persamaan tersebut sehingga didapatkan nilai  $LC_{50}$  ekstrak etanol 96% sebesar 255,87 ppm. Suatu zat dinyatakan memiliki aktivitas sitotoksik bila mempunyai nilai  $LC_{50} < 1000$  ppm sehingga ekstrak etanol 96% tanaman *B. cernua* menunjukkan adanya potensi terhadap aktivitas sitotoksik.

Hasil penapisan skrining fitokimia dari ekstrak etanol 96% pada tabel 1 menunjukkan bahwa mengandung senyawa metabolit sekunder berupa senyawa alkaloid, terpenoid, flavonoid dan tanin.



Gambar 1. Grafik hubungan log konsentrasi dengan nilai probit aktivitas sitotoksik *A. salina*

Tabel 1. Hasil skrining fitokimia ekstrak *B. cernua*

Golongan	Hasil
Alkaloid	+
Flavonoid	+
Terpenoid	+
Kuinon	-
Tanin	+

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

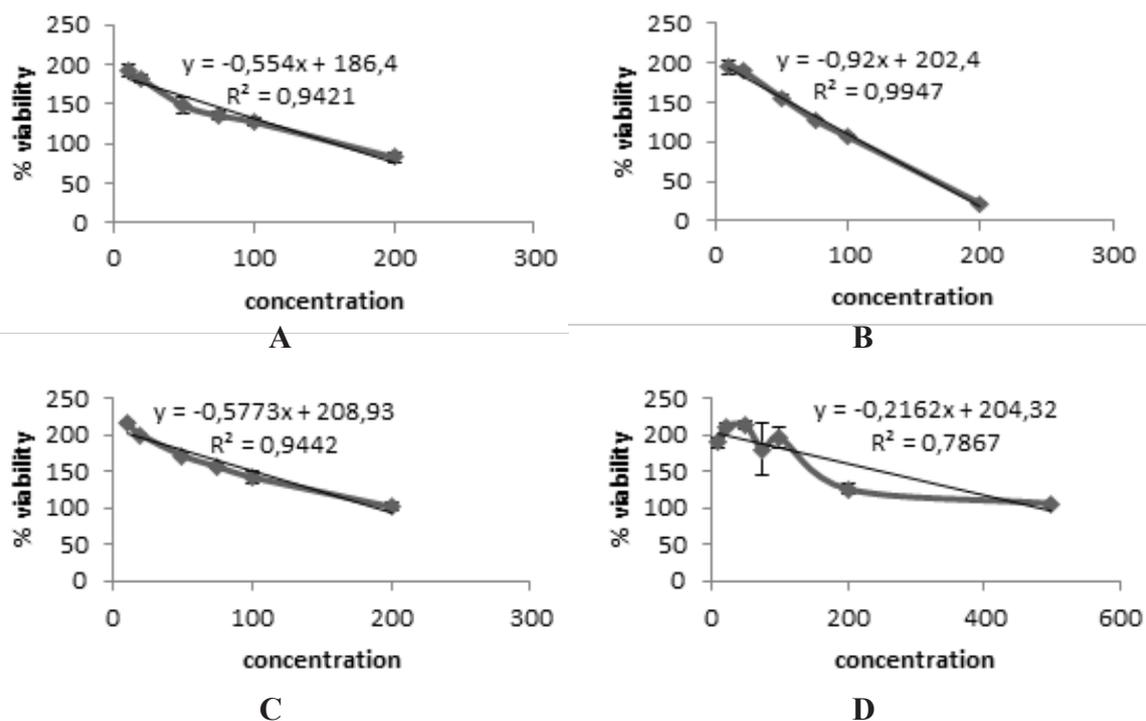
Profil kandungan kimia ekstrak sangat penting karena digunakan sebagai acuan untuk memperkirakan penelusuran mekanis kerja ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini.

Uji sitotoksik terhadap sel kanker MCF-7 dilakukan dengan melakukan konversi nilai absorbansi ekstrak dan ketiga fraksi *B.cernua* pada alat *ELISA Reader* ke dalam persen penghambatan pertumbuhan sel. Uji ini dilakukan untuk menghitung parameter nilai  $IC_{50}$  yaitu konsentrasi yang dapat menghambat sel kanker payudara sebesar 50%.

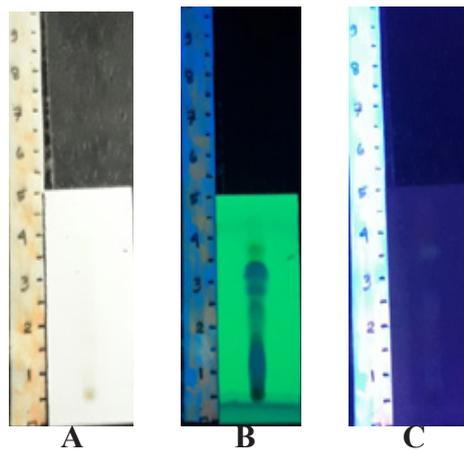
Berdasarkan Gambar 2, menunjukkan bahwa hasil pengujian aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 dari

ekstrak etanol 96% dan ketiga fraksi yaitu fraksi n-heksana, etilasetat dan air berturut-turut menghasilkan nilai konsentrasi hambat atau  $IC_{50}$  yaitu 246,841 ppm, 165,65 ppm, 562,57 ppm dan 713,78 ppm.

Analisa Kromatografi Lapis Tipis (KLT) digunakan untuk mengetahui pola kromatografi dan identifikasi awal senyawa yang terdapat pada ekstrak dan fraksi *B. cernua* menggunakan pelat KLT silikagel F254 dengan menggunakan fase gerak n-heksana : etilasetat (3:7). Pola kromatografi pada KLT ekstrak *B. cernua* dapat dilihat pada gambar 3 yang terlihat adanya pola senyawa yang berfluoresensi pada lampu UV 254 nm dan UV 365 nm.



Gambar 2. Grafik hubungan konsentrasi dengan prosentase pertumbuhan sel MCF-7 pada ekstrak etanol (A), fraksi n-heksana (B), fraksi etilasetat (C), dan fraksi air (D).



Gambar 3. Pola kromatografi lapis tipis (KLT) ekstrak *B. cernua* pada sinar tampak (A), sinar UV 254 nm (B), sinar UV 366 nm (C).

#### 4. Pembahasan

Uji aktivitas sitotoksik metode *Brine Shrimp Lethality Test* digunakan sebagai pengujian pendahuluan dalam penapisan senyawa antikanker dari bahan alam. Berdasarkan nilai  $LC_{50}$  yang telah dianalisis terhadap sampel ekstrak etanol 96% *B. cernua* menunjukkan nilai  $LC_{50}$  sebesar 255,87 ppm yang dapat disimpulkan sementara memiliki potensi aktivitas sitotoksik terhadap hewan coba larva *A. salina* Leach karena memiliki nilai  $LC_{50}$  kurang dari 1000 ppm<sup>7</sup>. Mekanisme kematian larva ini diduga karena potensi golongan senyawa yang terdapat di dalam ekstrak daun *B. cernua* yaitu oleh senyawa flavonoid dengan mekanisme menghambat daya makan larva (*antifeedant*/pengelak makanan) dengan bertindak sebagai *stomach poisoning* atau racun perut. Dengan demikian, nilai  $LC_{50}$  ekstrak etanol 96% daun *B. cernua* yang diperoleh dari pengujian pra-skrining sitotoksik terhadap larva *A. salina* yaitu 255,87 ppm memiliki gambaran ekstrak *B. cernua* memiliki potensi sebagai senyawa antikanker untuk selanjutnya akan dilakukan pengujian lanjut dengan sel kanker payudara MCF-7 secara *in vitro*.

Pengujian aktivitas sitotoksik ekstrak etanol dan ketiga fraksi *B. cernua* terhadap sel kanker payudara MCF-7 secara *in vitro* menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 dari ekstrak etanol 96% dan ketiga fraksi yaitu fraksi n-heksana, etilasetat dan air berturut-turut menghasilkan nilai  $IC_{50}$  yaitu 246,841 ppm, 165,65 ppm,

562,57 ppm dan 713,78 ppm.

Dengan demikian, fraksi n-heksana dapat digunakan sebagai dasar dalam proses isolasi untuk mendapatkan senyawa murni yang berpotensi sebagai senyawa kandidat antikanker. Berdasarkan penelitian pendahuluan menunjukkan senyawa doxorubisin sebagai kontrol positif pengujian terhadap sel kanker payudara MCF-7 memiliki nilai  $IC_{50}$  sebesar  $6\mu M$ <sup>8</sup>. Doxorubisin merupakan agen kemoterapi yang banyak digunakan dalam pengobatan kanker. Umumnya doxorubisin digunakan dalam bentuk kombinasi dengan agen antikanker lainnya seperti siklofosamid, cisplatin dan 5-FU. Peningkatan respon klinis dan pengurangan efek samping cenderung lebih baik pada penggunaan kombinasi dengan agen lain dibandingkan penggunaan doxorubisin tunggal<sup>9</sup>. Oleh karena itu pengembangan agen antikanker dari alam dengan efek samping yang rendah maupun agen kombinasi yang dapat menurunkan efek samping doxorubisin masih perlu terus diupayakan dalam mekanisme agen kemopreventif antikanker.

#### 5. Kesimpulan

Fraksi n-heksana *B. cernua* memiliki aktivitas sitotoksik tertinggi terhadap sel kanker payudara MCF-7 dengan nilai  $IC_{50}$  165,65 ppm dibandingkan terhadap fraksi etilasetat dan fraksi air.

#### 6. Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini dibiayai oleh Hibah

DRPM Kemenristek Dikti dalam Hibah Penelitian Kerjasama Perguruan Tinggi (PEKERTI) Tahun 2017 antara Universitas Cenderawasih dan Cancer Chemopreventive Research Center (CCRC) Fakultas Farmasi UGM melalui Surat Kontrak No. 03/UN20.2.2/PP/PEKERTI/2017.

#### Daftar Pustaka

1. Moelyono, MW. Etnofarmasi. Yogyakarta : Deepublish. 2014, 208-213
2. CDC. Statistics for Different Kinds of Cancer [diunduh 29 Agustus 2017]. Tersedia dari: <http://www.cdc.gov/cancer/dcpc/data/types.htm>
3. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2014. Diakses pada tanggal 9 September 2017. Tersedia dari <http://www.depkes.go.id/resources/download/general/Hasil%20Risksdas%202013.pdf>
4. Fitriyanti, Wathan, N., Gunawan. Kajian Farmakognostik Tumbuhan Sugi-sugi (*Breynia cernua* Muel. Arg.) Asal Amuntai Kalimantan Selatan. *Journal Pharmascience*. 2016;3(2): 43-48.
5. Khan, M.R. & Omoloso, AD. Antibacterial and Antifungal Activities of *Breynia cernua*. 2008. *Journal Fitoterapia*. doi:10.1016/j.fitote.2008.02.008
6. Farnsworth, N.R. Biological and Phytochemical Screenings of Plant. *J. Pharm. Sci*. 1966;55(3):225-265.
7. Meyer, B.N., Ferigni, N.R., Putnam, J.E., Jaconsen, L.B., Nichols, D.F., and Mclaughlin, J.L. Brine Shimp A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*. 1982;45:31-34.
8. Meiyanto, E., Putri, DDP, Susidarti RA, Murwanti R., Sardjiman., Fitriyanti A, Husnaa U, Purnomo H, Kawaichi M. Curcumin and its Analogues (PGV-0 and PGV-1) Enhance Sensitivity of Resistant MCF-7 Cells to Doxorubicin through Inhibition of HER2 and NF-kB Activation. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(1): 179-184.
9. Bruton L, Lazo JS, and Parker KL. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th Edition, McGrawHill, Lange. 2005.