

Original Research Paper

Aktivitas Sitotoksik Ekstrak dan Fraksi *Castanopsis argentea* (Blume) A.DC. pada Sel Kanker Payudara MCF-7

Cytotoxic Activity of *Castanopsis argentea* (Blume) A.DC. Extract and Fraction on MCF-7 Breast Cancer Cell

Anisa Diana Nastiti¹, Muhammad Imam Surta², Intani Quarta Lailaty², Frisca Damayanti²,
Tri Rini Nuringtyas^{1,3*}

¹Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Jl. Teknik Selatan, Sekip Utara, Yogyakarta, 55281, Indonesia.

²Kebun Raya Cibodas, Pusat Penelitian Konservasi Tumbuhan dan Kebun Raya, Badan Riset dan Inovasi Nasional, Jawa Barat, 43253, Indonesia

³Pusat Studi Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 55281, Indonesia

*Corresponding Author: tririni@ugm.ac.id

Abstrak: Kanker payudara merupakan kanker yang paling umum diderita oleh wanita dan menjadi penyebab utama kematian. Peningkatan efek negatif dan rendahnya efikasi dari obat kanker yang ditawarkan menyebabkan penelitian untuk menemukan pengobatan alternatif kanker payudara terus dilakukan. *Castanopsis argentea* atau saninten merupakan tumbuhan herbal asli Indonesia yang belum diketahui potensinya untuk terapi kanker payudara. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis aktivitas sitotoksik ekstrak dan fraksi daun dan ranting *C. argentea* pada sel kanker payudara MCF-7. Ekstraksi *C. argentea* dilakukan secara maserasi dengan pelarut etil asetat, etanol 70% dan akuades. Berdasarkan uji sitotoksitas *MTT Assay*, ekstrak etil asetat ranting memiliki nilai IC_{50} terbaik (310,72 $\mu\text{g/mL}$) dengan aktivitas sitotoksik lemah. Lebih lanjut, Fraksi 3 (n-heksan:etil asetat = 4:2) dari ekstrak potensial menunjukkan nilai IC_{50} terendah, yaitu 88,06 $\mu\text{g/mL}$ (sitotoksik sedang) dengan indeks selektivitas (SI) terhadap sel Vero sebesar 14,86 (>3). Analisis *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* melaporkan bahwa kandungan senyawa Fraksi 3 yang kemungkinan terlibat dalam penghambatan sel MCF-7 adalah golongan alkana, alkin terminal, alkohol lemak, amida lemak, dan asam lemak. Dengan demikian, studi ini membuktikan bahwa ekstrak dan fraksi *C. argentea* memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel MCF-7.

Kata kunci: *Castanopsis argentea*; ekstrak; fraksi, sel MCF-7, sitotoksitas

Abstract: Breast cancer is the most common cancer in women and become the main cause of death. The increase in negative effects and low efficacy of cancer drugs has led researchers to find alternative treatments. *Castanopsis argentea* or saninten is native herbal plant of Indonesia whose potential for breast cancer therapy is unknown. This study aims to analyze the cytotoxic activity of leave and stem extracts and fractions from leave and stem of *C. argentea* on MCF-7 breast cancer cells. *Castanopsis argentea* was extracted by maceration with ethyl acetate, ethanol 70% and water. Based on *MTT Assay*, ethyl acetate extract of stem has the best IC_{50} value (310.72 $\mu\text{g/mL}$) with weak cytotoxic activity. Furthermore, Fraction 3 (n-hexane:ethyl acetate = 4:2) from potential extract showed the lowest IC_{50} of 88.06 $\mu\text{g/mL}$ (moderate cytotoxic activity) and selectivity index to Vero cells and MCF-7 cells of 14.86 (>3). Gas Chromatography-Mass Spectrometry analysis reported that Fraction 3 compounds may involved in MCF-7 cells inhibition are alkanes, terminal alkynes, fatty alcohols, fatty amide, and fatty acids. This study proves that extract and fraction of *C. argentea* has cytotoxic activity on MCF-7.

Keywords: *Castanopsis argentea*; cytotoxicity; extracts; fractions; MCF-7 cells

Dikumpulkan : 7 Desember 2024

Direvisi : 5 Maret 2025

Diterima : 16 April 2025

Dipublikasi:30 April 2025

Pendahuluan

Kanker merupakan penyakit ganas yang menyerang organisme multiseluler dengan cara menginduksi pertumbuhan dan penyebaran sel-sel secara tidak terkendali pada organ tubuh yang lain (Torre *et al.*, 2016; Haryanti & Widiyastuti, 2017). Kanker termasuk penyebab teratas kematian di seluruh dunia karena kompleksitasnya yang sulit ditangani, terbukti mengakibatkan hampir 10 juta kematian pada tahun 2020 (WHO, 2022). Kanker payudara adalah jenis kanker yang paling umum diderita oleh wanita dan menjadi kasus baru kanker dengan jumlah tertinggi di dunia pada tahun 2020, tercatat sebanyak 2,26 juta kasus (WHO, 2022). Kanker payudara merupakan sel tumor ganas dari saluran dan lobulus jaringan payudara yang membelah secara abnormal dan menyerang jaringan dan organ di sekitarnya (Rodrigues, 2021).

Selama ini, pengembangan terapi kanker payudara secara komprehensif terus dilakukan melalui berbagai pendekatan. Namun, beberapa agen kemoterapi yang diaplikasikan memiliki kelemahan karena bersifat sitotoksik terhadap sel normal di sekitar sel kanker. Selain itu, kemoterapi memberikan efek samping berupa gastrointestinal (mual dan muntah), alopecia (kerontokan rambut), dan mielosupresi (penurunan sel-sel darah), sehingga pasien akan mengalami penurunan kualitas hidup akibat penyakit kanker (Amin, Gani, & Purwanti, 2020; Pearce *et al.*, 2017). Dengan demikian, pengembangan agen kemopreventif dari bahan alam diperlukan sebagai alternatif pengobatan dan pencegahan penyakit kanker yang efektif, aman dan minim efek samping.

Riset Tumbuhan Obat dan Jamu pada tahun 2012 melaporkan bahwa 502 ramuan yang berasal dari tumbuhan telah dimanfaatkan oleh berbagai suku di Indonesia sebagai obat tradisional kanker payudara (Haryanti & Widiyastuti, 2017). Salah satu spesies tumbuhan herbal asli Indonesia yang berpotensi sebagai kandidat obat antikanker payudara adalah *Castanopsis argentea*, dikenal sebagai saninten. *Castanopsis argentea* (Blume) A.DC. merupakan tanaman berkayu dari Familia Fagaceae yang diketahui mengandung senyawa metabolit sekunder berupa asam fenolik,

flavonoid, saponin, tanin, glukosida fenolik galoil, asam kuinat terasilasi, dan glikosida flavonol (Tuyen *et al.*, 2016).

Para peneliti telah banyak melaporkan efek farmakologis berbagai spesies dari Genus *Castanopsis* sebagai antikanker, salah satunya aktivitas antikanker ekstrak kulit batang *Castanopsis indica* pada KB *cell line* (sel karsinoma epitel manusia) (Dolai *et al.*, 2012). Berdasarkan penelitian Oh *et al.* (2021), senyawa 3,3',4-tri-O-methylelagic acid dari ekstrak batang *Castanopsis cuspidata* mampu menurunkan viabilitas sel kanker leukemia HL-60 menjadi 84,6% dengan *Cell Counting Kit* (CCK) Assay. Namun, potensi antikanker daun dan ranting *C. argentea* terhadap sel kanker payudara MCF-7 belum pernah diteliti sebelumnya.

Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menganalisis aktivitas sitotoksik fraksi dan ekstrak dari daun dan ranting *C. argentea* terhadap sel kanker payudara MCF-7. Pada penelitian ini, daun dan ranting *C. argentea* diekstraksi dengan metode maserasi dan ekstrak diaplikasikan pada sel MCF-7 melalui uji sitotoksik *MTT Assay*. Ekstrak paling potensial dilanjutkan ke tahap fraksinasi dengan *Vacuum Liquid Chromatography* (VLC). Setelah sitotoksitas fraksi terhadap sel MCF-7 diketahui, dilakukan identifikasi senyawa pada fraksi paling potensial melalui metode *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS).

Bahan dan Metode

Bahan

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini adalah simplisia daun dan ranting *Castanopsis argentea* (Blume) A.DC. yang diperoleh dari Kebun Raya Cibodas, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN). Bahan ekstraksi dan fraksinasi antara lain pelarut etanol PA 96% (Merck), etil asetat PA (Merck), etanol 70% (Merck), n-heksana PA (Merck), akuades dan serbuk silika gel 60 GF₂₅₄ (Merck). Bahan-bahan untuk uji sitotoksik *MTT Assay* ialah kultur sel MCF-7 dan sel Vero, media padat *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Elabscience), *Fetal Bovine Serum* atau FBS (Gibco), *penicillin-streptomycin* (Sigma), *fungizone* (Gibco), *Phosphate-buffered saline* atau PBS (Sigma),

MTT 5 mg/mL (Sigma), *Sodium Dodecyl Sulphate* atau SDS (Merck), trypsine-EDTA (Sigma), aluminium foil, dan *dimethyl sulphoxide* atau DMSO (Merck).

Alat

Alat yang digunakan dalam pelaksanaan penelitian adalah alat-alat gelas (Pyrex), *rotary evaporator* (Stuart), *ELISA reader* (BIO-RAD model 680XR), mikroskop *inverted*, mikropipet 20, 200, 1000 μ L (Gilson Pipetman), *counting chamber*, *hand counter*, inkubator CO₂ (Memmert), *centrifuge* (Hettich Mikro), pompa vakum, dan *scientered glass* (Pyrex). Alat identifikasi senyawa ialah instrumen GC-MS (Shimadzu).

Preparasi ekstrak dan fraksi *Castanopsis argentea*

Sebanyak 25 g serbuk *C. argentea* dimaserasi dalam 250 mL pelarut polar (akuades) dan pelarut semi-polar (etil asetat dan etanol 70%) pada suhu ruang selama 3-4 hari. Sampel dengan pelarut akuades didekoksi terlebih dahulu. Filtrat hasil maserasi diuapkan pada *rotary evaporator* (kecepatan 30 rpm, suhu 40-50 °C) untuk memperoleh ekstrak cair. Hasil ekstrak potensial sebagai antikanker difraksinasi dengan metode *Vacuum Liquid Chromatography* menggunakan fase diam berupa serbuk silika gel 60 GF₂₅₄ dan fase gerak berupa eluen n-heksana dan etil asetat dengan tujuh macam perbandingan.

Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Untuk penentuan profil senyawa pada ketujuh jenis fraksi, dilakukan identifikasi secara kualitatif dengan metode KLT. Plat silika gel 60 GF₂₅₄ digunakan sebagai fase diam, sedangkan eluen n-heksana:etil asetat (6:4) berperan sebagai fase gerak. Selanjutnya, eluen dimasukkan dalam gelas TLC dan diamati kejenuhannya dengan kertas saring. Letakkan plat KLT dalam gelas chamber dan tunggu hingga eluen bergerak pada batas atas. Keringkan kembali plat dengan oven dan noda hasil KLT diamati pada cahaya tampak, sinar UV λ 254 nm dan 366 nm..

Kultur Sel

Cell line kanker payudara MCF-7 diperoleh dari FKMK, Universitas Gadjah

Mada, Yogyakarta. Sel MCF-7 ditumbuhkan pada media lengkap *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) yang ditambahkan FBS 10 %, penicillin-streptomycin 1% dan fungizone. Kultur sel MCF-7 diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37 °C. Media kultur diganti setelah 24 jam dan sel ditumbuhkan lagi hingga 80% konfluen. Sel yang kondisinya 80% konfluen siap dipanen dan digunakan dalam uji sitotoksitas.

Uji Sitotoksitas MTT Assay

Kultur sel MCF-7 ditransfer ke dalam 96-well-plate dengan kepadatan 1×10^4 sel/sumuran dan diinkubasi selama 24 jam. Sel diberi perlakuan dengan memasukkan berbagai seri konsentrasi ekstrak dan fraksi sebanyak 100 μ L/sumuran. Media sel dibuang dan dicuci dengan PBS sebanyak 2-3 kali, serta ditambahkan 100 μ L reagen MTT (5 mg/mL) untuk proses inkubasi selama 4 jam pada suhu 37 °C. Kondisi sel diamati dengan mikroskop *inverted* dan kristal formazan berwarna ungu akan terbentuk karena reaksi sel hidup dengan reagen MTT. Kristal yang terbentuk dilarutkan dengan penambahan larutan *stopper* (SDS 10%) sebanyak 100 μ L dan diinkubasi selama semalam. Absorbansi masing-masing sumuran dibaca pada panjang gelombang 595 nm menggunakan *ELISA reader* untuk memperoleh persentase viabilitas sel dan nilai IC₅₀.

Identifikasi GC-MS

Identifikasi senyawa bioaktif fraksi potensial dilakukan dengan metode GC-MS. Instrumen GC-MS terdiri dari kolom GC DB-5MS dengan diameter sebesar 0,25 mm, panjang 30 m dan tebal 0,25 μ m. Sebanyak 3 μ L sampel fraksi 3 disuntikkan pada kolom GC dengan mode *splitless*. Gas pembawa yang digunakan adalah gas helium yang memiliki laju alir 30,5 mL/menit. Temperatur yang digunakan diatur pada 60-300 °C dan setiap menitnya suhu naik sebesar 5 °C dengan total running 80 menit. Spektrofotometri massa diatur dalam kondisi detektor elektron ionisasi volt 70 elektron (EI 70 Ev).

Hasil dan Pembahasan

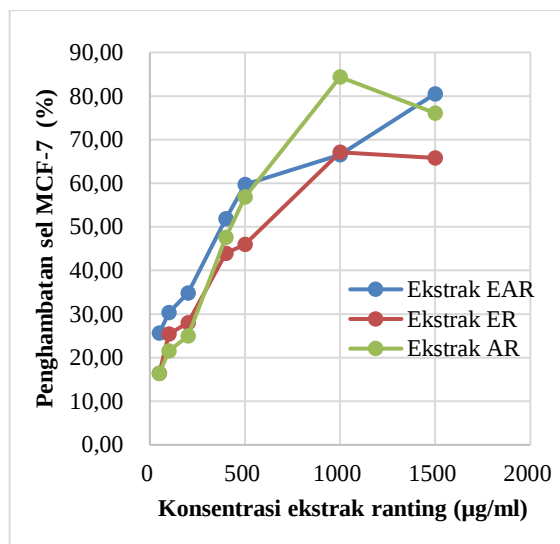
Hasil

Ekstraksi *Castanopsis argentea*

Rendemen ekstrak dari hasil maserasi dihitung dengan cara membandingkan berat ekstrak kental dengan berat kering sampel (b/b). Berdasarkan proses ekstraksi serbuk simplisia *C. argentea* dengan pelarut etil asetat, etanol 70% dan akuades, diperoleh rendemen ekstrak yang berbeda-beda. Ekstraksi daun *C. argentea* dengan pelarut etil asetat, etanol 70% dan akuades berturut-turut menghasilkan rendemen sebesar 9,12%, 15,8%, dan 11,12%. Pada ranting *C. argentea*, rendemen yang diperoleh dari pelarut etil asetat, etanol 70% dan akuades secara berurutan sebesar 2%, 13,76% dan 11,64%. Secara keseluruhan, perbedaan hasil rendemen ekstrak dari setiap pelarut mengindikasikan adanya perbedaan komposisi senyawa polar dan non-polar dari sampel daun dan ranting *C. argentea*.

Aktivitas Sitotoksik Ekstrak *C. argentea*

Ekstraksi sampel *C. argentea* menghasilkan enam jenis ekstrak, yaitu ekstrak etil asetat daun (EAD), ekstrak etanol 70% daun (ED), ekstrak akuades daun (AD), ekstrak etil asetat ranting (EAR), ekstrak etanol 70% ranting (ER), dan ekstrak akuades ranting (AR). Ekstrak tersebut diuji kemampuan sitotoksiknya terhadap sel kanker payudara MCF-7 dengan *MTT Assay*. Ekstrak daun tidak menunjukkan aktivitas sitotoksik yang baik terhadap sel MCF-7. Berdasarkan optimasi uji *MTT Assay* yang telah dilakukan, hasil aktivitas sitotoksik ekstrak ranting *C. argentea* dengan tiga jenis pelarut ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Aktivitas sitotoksik ekstrak ranting *C. argentea* terhadap sel MCF-7

Gambar 1 menunjukkan hubungan antara konsentrasi ekstrak ranting terhadap persentase penghambatan sel kanker MCF-7, dimana semakin besar konsentrasi ekstrak yang diaplikasikan pada sel maka persentase penghambatan sel MCF-7 semakin meningkat. Persentase penghambatan sel selanjutnya diubah dalam bentuk angka probit dan dianalisis secara regresi linear untuk memperoleh nilai IC_{50} pada setiap perlakuan. Nilai IC_{50} ekstrak daun dan ranting *C. argentea* terhadap sel kanker payudara MCF-7 menunjukkan potensi sitotoksitas yang berbeda, sebagaimana ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai IC_{50} ekstrak *C. argentea* terhadap sel kanker payudara MCF-7

Jenis ekstrak	Nilai IC_{50} (µg/ml)	Aktivitas sitotoksik
Etil asetat daun (EAD)	1226,63	Tidak toksik
Etanol 70% daun (ED)	387,29	Lemah
Akuades daun (AD)	415,41	Lemah
Etil asetat ranting (EAR)	310,72	Lemah
Etanol 70% ranting (ER)	536,16	Tidak toksik
Akuades ranting (AR)	362,45	Lemah

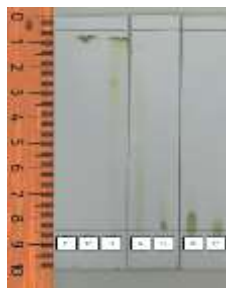
***BOLD:** Ekstrak dengan nilai IC_{50} terendah

Berdasarkan Tabel 1, ekstrak etil asetat ranting *C. argentea* merupakan ekstrak dengan nilai IC_{50} terkecil, yaitu 310,72 $\mu\text{g/ml}$ dan digolongkan toksik lemah terhadap sel MCF-7. Oleh karena itu, dilakukan fraksinasi terhadap ekstrak EAR untuk memperoleh senyawa yang lebih murni dengan aktivitas sitotoksik lebih baik berdasarkan perbedaan polaritas.

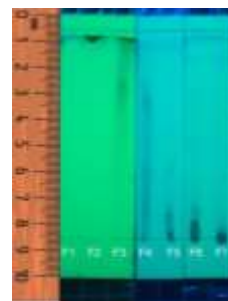
Proses fraksinasi dilakukan dengan metode *Vacuum Liquid Chromatography* (VLC). Proses penuangan eluen pada kolom dilakukan secara berurutan dari eluen dengan tingkat kepolaran paling rendah (n-heksan 100%) hingga eluen dengan tingkat kepolaran paling tinggi, yaitu etil asetat 100%. Berdasarkan penjelasan Zhang, Lin & Ye (2018), sifat polar pada serbuk silika gel akan menyebabkan terbentuknya ikatan hidroksi antara silika gel dengan senyawa yang bersifat polar, sehingga senyawa tersebut meninggalkan kolom terakhir.

Tujuh fraksi yang dihasilkan dari ekstrak etil asetat ranting *C. argentea* mempunyai massa fraksi yang berbeda-beda. Fraksi n heksan:etil asetat dengan perbandingan 5:1 dan 4:2 memiliki massa yang paling besar secara berturut-turut, yakni 0,46 g dan 0,42 g. Hal ini membuktikan bahwa ekstrak etil asetat ranting *C. argentea* sebagian besar mengandung senyawa yang bersifat non polar.

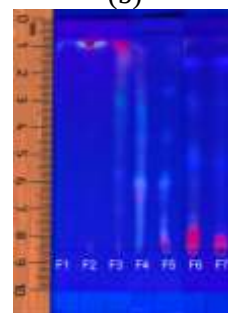
Tahap fraksinasi melalui VLC dilanjutkan dengan penentuan profil kromatogram secara kualitatif menggunakan teknik kromatografi lapis tipis (KLT). Fraksi dengan profil senyawa yang mirip akan digabungkan untuk penyederhanaan fraksi sebelum diuji ke sel kanker payudara MCF-7. Pola kromatogram KLT dapat dilihat pada Gambar 2.



(a)



(b)



(c)

Gambar 2. Hasil kromatografi lapis tipis dari 7 fraksi ekstrak etil asetat ranting *C. argentea* pada eluen fase gerak n-heksan:etil asetat (6:4): (a) Sinar tampak, (b) Visualisasi sinar UV 254 nm, (c) Visualisasi sinar UV 366 nm

Aktivitas Sitotoksik Fraksi *C. argentea*

Berdasarkan hasil analisis *MTT Assay* pada Tabel 2, hasil fraksinasi menggunakan pelarut n-heksana dan etil asetat menunjukkan kemampuan sitotoksik yang lebih baik dibanding ekstrak etil asetat ranting *C. argentea* (Tabel 1).

Tabel 2. Nilai IC_{50} fraksi dari ekstrak etil asetat ranting *C. argentea* terhadap sel kanker payudara MCF-7

Jenis Fraksi	Nilai IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	Aktivitas sitotoksik
F2 (n heksana : etil asetat = 5:1)	485,6	Lemah
F3 (n heksana : etil asetat = 4:2)	88,06	Sedang
F4 (n heksana : etil asetat = 3:3)	210,93	Lemah
F5 (n heksana : etil asetat = 2:4)	263,36	Lemah
F6 dan F7 (n heksana : etil asetat = 1:5 dan etil asetat = 100%)	671,18	Tidak toksik

***BOLD:** Fraksi dengan nilai IC_{50} terendah

Tabel 2 melaporkan bahwa fraksi 2, fraksi 4, dan fraksi 5 memiliki aktivitas sitotoksik lemah karena konsentrasi penghambatan 50% sel MCF-7 berkisar antara 201-500 µg/ml (Damasuri, Sholikhah, & Mustofa, 2020). Sementara itu, fraksi 6 dan 7 yang telah digabungkan tidak memiliki sitotoksitas terhadap sel MCF-7, ditunjukkan dengan nilai IC₅₀ sebesar 671,18 µg/ml (IC₅₀>500 µg/ml). Dari kelima fraksi, Fraksi 3 yang terdiri dari campuran n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 4:2 memiliki nilai IC₅₀ paling rendah, yaitu 88,06 µg/ml. Nilai IC₅₀ Fraksi 3 < 100 µg/ml, sehingga aktivitas sitotoksik terhadap sel MCF-7 termasuk kategori sedang.

Sebagai fraksi paling potensial, fraksi 3 (n-heksana:etil asetat = 4:2) perlu diujikan pada sel normal Vero. Nilai indeks selektivitas Fraksi 3 terhadap sel Vero dan sel MCF-7 adalah 14,86 (>1), yang berarti nilai IC₅₀ Fraksi 3 terhadap sel Vero 14,86 kali lebih tinggi dibanding nilai IC₅₀ Fraksi 3 terhadap sel MCF-7.

Senyawa Fraksi Potensial *C. argentea*

Analisis kandungan senyawa pada fraksi 3 (n heksana:etil asetat = 4:2) dilakukan melalui metode GC-MS. Berdasarkan hasil kromatogram GC-MS terhadap Fraksi 3, terdeteksi 10 jumlah senyawa dari 5 jenis golongan, yaitu alkana, alkin terminal, alkohol lemak, amida lemak, dan asam lemak (Tabel 3).

Tabel 3. Hasil identifikasi senyawa Fraksi 3 dengan GC-MS

Nama Senyawa	Golongan	Rumus Molekul	Peak Area (%)
Dodecane	Alkana	C ₁₂ H ₂₆	0,58
Heptacosane	Alkana	C ₂₇ H ₅₆	3,88
Tricosane	Alkana	C ₂₃ H ₄₈	2,36
Tetracosane	Alkana	C ₂₄ H ₅₀	10,95
9-Eicosyne	Alkin terminal	C ₂₀ H ₃₈	0,98
Docosaol	Alkohol lemak	C ₂₂ H ₄₆ O	2,48
1-Eicosanol	Alkohol lemak	C ₂₀ H ₄₂ O	12,64
Oleamide	Amida lemak	C ₁₈ H ₃₅ NO	2,25
Palmitic acid	Asam lemak	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	10,63

Linoleic acid	Asam lemak	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	4,81
---------------	------------	--	------

***BOLD:** Senyawa dengan luas area tinggi

Pada Tabel 3, terdapat tiga senyawa dengan konsentrasi tertinggi yang ditunjukkan dengan luas area terbesar, yaitu 1-eicosanol, tetracosane, dan palmitic acid. Ketiga senyawa ini diduga sebagai komponen utama fraksi 3 yang berperan dalam kematian sel kanker payudara MCF-7.

Pembahasan

Ekstraksi *Castanopsis argentea*

Hasil maserasi melaporkan bahwa rendemen ekstrak daun dan ranting *C. argentea* berkisar antara 2-15,8%. Perbedaan pelarut dalam proses ekstraksi memiliki pengaruh terhadap berat ekstrak. Pelarut etanol 70% menghasilkan rendemen ekstrak daun dan ranting tertinggi dengan perbedaan 2-12 g dibanding etil asetat dan akuades, artinya sebagian besar kandungan metabolit *C. argentea* cenderung bersifat polar hingga semi-polar. Polaritas pelarut diketahui dapat memengaruhi kuantitas dan kualitas metabolit sekunder. Etanol 70% dengan tingkat kepolaran cukup tinggi mampu mengekstrak metabolit dengan tingkat kepolaran yang sama. Hal ini karena senyawa fitokimia dengan sifat polaritas tertentu akan larut pada solven yang indeks polaritasnya sesuai (Wakeel *et al.*, 2019). Selain metabolit sekunder, senyawa polar lain seperti protein dan karbohidrat dapat ikut terlarut selama proses maserasi sehingga meningkatkan hasil ekstraksi (Do *et al.*, 2014).

Rendemen ekstrak daun dan ranting yang paling sedikit dihasilkan oleh pelarut etil asetat. Rendahnya hasil ekstraksi etil asetat membuktikan bahwa ekstrak daun dan ranting *C. argentea* mempunyai kandungan metabolit yang lebih dominan polar dibanding non-polar. Selain itu, hasil rendemen juga dipengaruhi oleh proses ekstraksi, waktu penyimpanan, suhu, bagian tanaman, dan akumulasi zat intrinsik pada jaringan tanaman (Nakamura *et al.*, 2017).

Berdasarkan Tabel 2, hasil rendemen dari ekstraksi daun *C. argentea* lebih tinggi dibanding ranting, membuktikan bahwa daun merupakan organ utama yang mampu mensintesis metabolit primer maupun metabolit

sekunder pada tumbuhan. Daun melakukan fotosintesis untuk menghasilkan glukosa dalam bentuk amilum yang termasuk molekul polar. Selain itu, terdapat 3 metabolit sekunder utama yang dimiliki oleh daun, yaitu terpenoid, fenolik, dan senyawa organik nitrogen (Yang *et al.*, 2020). Senyawa aktif berupa metabolit sekunder akan disintesis oleh daun sebagai bagian penting tanaman saat menghadapi patogen dan tekanan lingkungan (Verma & Shukla, 2015). Berkaitan dengan hal tersebut, terdapat beberapa faktor yang menyebabkan perbedaan kuantitas metabolit sekunder pada bagian tanaman, yaitu kekeringan, temperatur, radiasi, air, atau salinitas. Hasil ekstraksi ini didukung oleh penelitian Correia *et al.* (2022) yang bertujuan untuk membandingkan perbedaan berat ekstrak pekat pada bagian daun dan ranting salah satu spesies Magnoliopsida, yaitu *Acacia dealbata*. Ekstraksi menggunakan aseton 70% terhadap *A. dealbata* menghasilkan ekstrak kering daun yang lebih tinggi dibanding ranting, yakni sebesar 13,9-15,0% dengan ekstrak kering ranting sebesar 8,7-10,1% (Correia *et al.*, 2022).

Aktivitas Sitotoksik Ekstrak *C. argentea*

Secara keseluruhan, ekstrak *C. argentea* tidak menunjukkan aktivitas sitotoksik yang kuat terhadap sel kanker payudara MCF-7 (Tabel 1). Rendahnya kemampuan sitotoksik ekstrak disebabkan karena bentuk ekstrak daun dan ranting *C. argentea* masih berupa ekstrak kasar, sehingga kandungan senyawa bioaktif murni yang berperan sebagai kandidat antikanker berjumlah sedikit. Berdasarkan Tabel 3, ekstrak ED, AD, EAR, dan AR menunjukkan potensi toksisitas yang lemah terhadap sel MCF-7. *National Cancer Institute* (NCI) Amerika Serikat menggolongkan sitotoksitas senyawa dalam kategori aktivitas sitotoksik lemah jika memiliki nilai IC_{50} berkisar antara 201-500 $\mu\text{g/mL}$ (Damasuri *et al.*, 2020). Potensi sitotoksik daun dan ranting *C. argentea* dipengaruhi oleh kandungan senyawa metabolit sekunder yang melimpah pada Genus *Castanopsis*, antara lain asam fenolik, flavonoid, saponin, tanin, glikosida fenolik, asam kuinat terasilasi, dan glikosida flavonol (Tuyen *et al.*, 2016). Penelitian terdahulu menyatakan bahwa kandungan fenolik pada ekstrak batang *Castanopsis phuthoensis* dan *Castanopsis grandicaticrata* sangat tinggi.

Ekstrak etil asetat ranting *C. argentea* merupakan ekstrak dengan nilai IC_{50} terkecil, yaitu 310,72 $\mu\text{g/mL}$ dan digolongkan toksik lemah terhadap sel MCF-7. Potensi antikanker ekstrak EAR kemungkinan disebabkan karena konstituen bioaktif yang berpotensi toksik cenderung bersifat semi polar, sehingga lebih larut dalam pelarut etil asetat (Pamungkas & Indrayudha, 2019). Senyawa semi-polar yang dimungkinkan terikat oleh pelarut etil asetat adalah golongan polifenol. Senyawa polifenol yang terdiri dari flavonoid, fenolik, saponin, dan tanin memiliki bioaktivitas yang tinggi dalam menekan proliferasi sel kanker payudara MCF-7 melalui induksi apoptosis (Razak *et al.*, 2019). Penemuan tersebut menegaskan bahwa ekstrak EAR merupakan ekstrak paling potensial dan perlu diuji sitotoksikitas secara berkelanjutan, sehingga dilanjutkan ke proses fraksinasi.

Proses fraksinasi dilakukan dengan metode *Vacuum Liquid Chromatography* (VLC). Kromatografi merupakan cara untuk memisahkan senyawa alam yang masih berbentuk campuran dari ekstrak tanaman. VLC merupakan teknik kromatografi paling efisien untuk memisahkan campuran alami yang kompleks secara kasar maupun halus (Maurya *et al.*, 2018). Kelebihan VLC dibanding teknik kromatografi lainnya ialah menghasilkan pemisahan yang maksimal, biaya ekonomis, waktu yang relatif cepat, dan teknik yang mudah (Maurya *et al.*, 2018).

Analisis KLT memberikan hasil berupa spot-spot warna untuk membandingkan profil kromatogram senyawa yang terdapat pada seluruh fraksi. Striegel & Hill (1996) menyatakan bahwa spot warna terbentuk dari hasil interaksi antara metabolit bahan dengan fase diam yang didasarkan pada kepolarannya. Senyawa yang bersifat polar akan mudah terikat dan terbawa oleh eluen polar sedangkan senyawa non-polar akan mudah terelusi jika eluen bersifat non-polar, sehingga setiap metabolit akan berhenti pada jarak tertentu (Bele & Khale, 2011). Berdasarkan Gambar 2, diketahui bahwa terdapat dua fraksi yang memiliki kemiripan spot noda, yaitu fraksi 6 dan fraksi 7 sehingga kedua fraksi tersebut digabung. Kemiripan letak dan jumlah noda pada fraksi 6 dan 7 mengindikasikan bahwa senyawa metabolit sekunder pada kedua fraksi tersebut memiliki jenis dan tingkat

polaritas yang sama.

Sementara itu, fraksi lain menunjukkan pola yang berbeda-beda berdasarkan masing-masing noda yang terlihat pada sinar tampak, sinar UV λ 254 dan 366 nm. Fraksi 1 hingga fraksi 6 kemungkinan mengandung metabolit sekunder yang tidak sama. Fraksi 1 (n-heksana = 100%) tidak disertakan dalam pengujian sitotoksik karena tidak memperlihatkan noda warna, sehingga dianggap jumlah target metabolit sekunder non-polar yang diperoleh sangat sedikit. Setelah penggabungan fraksi, lima fraksi yang digunakan untuk uji sitotoksitas MTT Assay terhadap sel kanker MCF-7 adalah Fraksi 2, Fraksi 3, Fraksi 4, Fraksi 5, dan gabungan Fraksi 6 & 7.

Aktivitas Sitotoksik Fraksi *C. argentea*

Hasil fraksinasi ekstrak EAR menunjukkan potensi antikanker yang lebih tinggi dibanding bentuk ekstrak kasar. Hal ini disebabkan karena peningkatan konsentrasi senyawa spesifik yang terikat selama fraksinasi oleh pelarut etil asetat dan n-heksana (Priyadi *et al.*, 2021). Etil asetat merupakan pelarut semi-polar yang dapat melarutkan terpenoid, flavonoid, alkaloid, dan steroid sedangkan n-heksana termasuk pelarut polar yang mampu melarutkan steroid dan terpenoid secara optimal. Kandungan hidrokarbon jenuh dan asam alifatik pada ekstrak heksana serta flavonoid pada ekstrak etil asetat dilaporkan sebagai antikanker (Sianipar, Maarisit, & Valencia, 2013).

Berdasarkan uji sitotoksitas kelima fraksi, Fraksi 3 yang terdiri dari campuran n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 4:2 memiliki nilai IC_{50} paling rendah dibanding fraksi lainnya, yaitu 88,06 μ g/ml. Nilai IC_{50} Fraksi 3 < 100 μ g/ml, sehingga aktivitas sitotoksik terhadap sel MCF-7 termasuk kategori sedang dan berpotensi untuk dikembangkan sebagai pengobatan alternatif kanker payudara. Hasil analisis indeks selektivitas Fraksi 3 sebesar 14,86 (>3) menunjukkan bahwa Fraksi 3 sangat selektif dalam menghambat pertumbuhan sel kanker MCF-7. Senyawa metabolit sekunder pada Fraksi 3 tidak memiliki efek toksik yang merusak integritas fungsional membran sel normal, sehingga aman untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai bahan alami obat kanker di masa depan.

Identifikasi Senyawa Fraksi Potensial *C. argentea*

Pada Tabel 3, tiga senyawa dengan konsentrasi tertinggi yang ditunjukkan dengan luas area terbesar adalah 1-eicosanol, tetracosane, dan palmitic acid. Ketiga senyawa ini diduga sebagai komponen utama fraksi 3 yang berperan dalam kematian sel kanker payudara MCF-7. Senyawa 1-eicosanol dengan konsentrasi 12,64% (RT 51,358) merupakan senyawa golongan alkohol lemak berantai panjang karena memiliki atom karbon C_{20} . Senyawa ini disintesis secara alami sebagai penyusun lilin kutikula pada beberapa tumbuhan Magnoliopsida: *Hibiscus cannabinus*, *Arabidopsis thaliana*, *Hamamelis virginiana*, dan *Eucalyptus globulus*. Penelitian sebelumnya oleh Hsiung & Kadir (2011) melaporkan bahwa senyawa 1-eicosanol yang berasal dari fraksi asetat *Leea indica* (Classis: Magnoliopsida) berperan sebagai antitumor dan antikarsinogenik dengan cara menghambat pertumbuhan berbagai sel kanker. Selain eicosanol, alkohol lemak rantai panjang yang teridentifikasi pada fraksi 3 adalah docosanol. Hasil GC-MS selaras dengan penelitian Figueiredo *et al.* (2014), dimana docosanol pada ekstrak dan fraksi tumbuhan *Myoschilos oblongum* telah menunjukkan aktivitas sitotoksik secara *in vitro* terhadap sel tumor dengan mekanisme penghambatan angiogenesis dan metastasis.

Secara keseluruhan, golongan yang terdeteksi memiliki konsentrasi terbesar di antara kelima senyawa adalah alkana dengan total luas area sebesar 17,77%. Jenis metabolit sekunder yang termasuk alkana mempunyai atom C yang berkisar antara C_{12} - C_{27} , yaitu dodecane, heptacosane, tricosane, dan tetracosane. Beberapa senyawa spesifik ini memiliki aktivitas antikanker sebagaimana yang telah dibuktikan oleh penelitian terdahulu. Konsentrasi senyawa bioaktif tetracosane pada *C. argentea* cukup tinggi dengan luas area 10,95% (RT 62,757) dan diduga berperan sebagai antikanker payudara sel MCF-7. Hasil ini didukung oleh riset Fajarina *et al.* (2021) yang menemukan bahwa tetracosane dan dodecane pada kalus jeruk purut bersifat sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D. Sementara itu, metabolit sekunder tricosane dan heptacosane termasuk komponen utama *Zingiber*

striolatum (Zingiberaceae) dan *Glandora rosmarinifolia* (Boraginaceae) yang memiliki nilai $IC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$ terhadap sel kanker liver HA22T dan sel leukemia K562, sehingga berpotensi sebagai antikanker (Sharma *et al.*, 2022).

Tabel 3 juga menunjukkan bahwa palmitic acid merupakan senyawa ketiga yang paling dominan dari golongan asam lemak karena memiliki konsentrasi dengan luas area 10,63% (RT 37,899). Palmitic acid dapat ditemukan secara alami pada tumbuhan dan alga. Pada *Pseuduvaria macrophylla* (Classis: Magnoliopsida), palmitic acid adalah senyawa utama yang terdeteksi mampu menghambat sel kanker leukemia melalui jalur apoptosis (Aziz *et al.*, 2016). Berdasarkan hasil GC-MS dan teori penelitian sebelumnya, sepuluh jenis senyawa pada Fraksi 3 telah terbukti menunjukkan aktivitas sitotoksitas yang baik terhadap sel kanker payudara MCF-7. Meskipun begitu, beberapa senyawa toksik tersebut belum berbentuk murni, sehingga dapat dilakukan pemurnian fraksi potensial untuk mengetahui senyawa spesifik yang bertindak menghambat pertumbuhan sel kanker MCF-7.

Kesimpulan

Berdasarkan studi yang telah dilakukan, disimpulkan bahwa ekstrak etil asetat ranting *C. argentea* dan Fraksi 3 (n-heksana:etil asetat = 4:2) menunjukkan aktivitas sitotoksik terbaik terhadap sel kanker payudara MCF-7. Kandungan metabolit sekunder fraksi 3 yang terlibat dalam penghambatan sel MCF-7 adalah senyawa golongan alkana, alkin terminal, alkohol lemak, amida lemak, dan asam lemak. Dengan demikian, ekstrak dan fraksi *C. argentea* berpotensi dikembangkan sebagai kandidat obat kanker payudara.

Ucapan terima kasih

Kami mengucapkan terima kasih kepada Kebun Raya Cibodas, Badan Riset dan Inovasi Indonesia yang telah mendanai penelitian ini. Kami juga mengucapkan terima kasih kepada Fakultas Biologi dan Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan Universitas Gadjah Mada yang telah

menyediakan fasilitas selama penelitian.

Referensi

- Aziz, A., Taha, H., Mohebali, M., Chung, Y. L., Ismail, N. H., Bakar, M. Z. A. & Yusof, F. Z. M. (2016). Anti-Cancer Potential of *Pseuduvaria Macrophylla* in Human Cancer Cell Lines. *Journal of Advanced Research in Applied Sciences and Engineering Technology*, 4 (1): 1-11. URL: <https://www.akademiabaru.com/submit/index.php/araset/article/view/1895>.
- Amin, A., Gani, A. P. & Murwanti, R.. (2020). Cytotoxic activities of (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) ethanolic extract and its fractions on human colon cancer cell WiDr. *Traditional Medicine Journal*, 25 (1): 29-33. DOI: <https://doi.org/10.22146/mot.48189>.
- Bele, A. A. & Khale, A. (2011). An Overview on Thin Layer Chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Science and Research*, 2 (2): 256-267. ISSN: 0975-8232.
- Correia, R., Duarte, M. P., Maurício, E. M., Brinco, J., Quintela, J. C., da Silva, M. G. & Gonçalves, M. (2022). Chemical and Functional Characterization of Extracts from Leaves and Twigs of *Acacia dealbata*. *Processes*, 10 (2429): 1-21. DOI: <https://doi.org/10.3390/pr10112429>.
- Damasuri, A. R., Sholikhah, E. N. & Mustofa. (2020). Cytotoxicity of ((E)-1-(4-aminophenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one)) on Helacell line. *Indonesian Journal of Pharmacology and Therapy*, 1 (2): 54-59. DOI: <https://doi.org/10.22146/ijpther.606>.
- Dolai, N., Karmakar, I., Kumar, R. B., Bala, A., Mazumder, U. K. & Haldar, P. K. (2012). Antitumor Potential of *Castanopsis indica* (Roxb. ex Lindl.) A. DC. Leaf Extract against Ehrlich's Ascites Carcinoma Cell. *Indian Journal of Experimental Biology*, 50 (5): 359-365. PMID: 22803326.
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E.,

- Ismadji, S. & Ju, Y. (2014). Effect of Extraction Solvent on Total Phenol Content, Total Flavonoid Content, and Antioxidant Activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22 (3): 296-302. DOI: 10.1016/j.jfda.2013.11.001.
- Fajarina, S., Prabowo, B. H., Damayanti, F., Widayarsi, A., Sasongko, A. B., Indrianto, A., Semiarti, E., Hidayati, L. & Tunjung, W. A. S. (2021). Evaluation of Anticancer Bioactive Compounds and Cytotoxicity of Kaffir Lime (*Citrus hystrix* Dc.) Callus Extract Post Preservation. *Indonesian Journal of Pharmacy*, 32 (2): 179–192. DOI: <https://doi.org/10.22146/ijp.1062>.
- Figueiredo, C. R., Matsuo, A. L., Massaoka, M. H., Girola, N., Azevedo, R. A., Rabaca, A. N., Farias, C. F., Perira F. V., Matias, N. S., Silva L. P., Rodrigues, E. G., Lago, J. H. G., Travassos, L. R. & Silva, M. R. G. (2014). Antitumor Activity of *Kielmeyera coriacea* Leaf Constituents in Experimental Melanoma, Tested In Vitro and In Vivo in Syngeneic Mice. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 4 (Supplement 1): 429-436. DOI: 10.5681/apb.2014.063.
- Haryanti, S. & Widiyastuti, Y. (2017). Aktivitas Sitotoksik pada Sel MCF-7 dari Tumbuhan Indonesia untuk Pengobatan Tradisional Kanker Payudara. *Media Litbangkes*, 27 (4): 247–254. DOI: 10.22435/mpk.v27i4.5010.247-254
- Hsiung, W. Y. & Kadir, H. A. (2011). *Leea indica* Ethyl Acetate Fraction Induces Growth-Inhibitory Effect in Various Cancer Cell Lines and Apoptosis in Ca Ski Human Cervical Epidermoid Carcinoma Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 293060. DOI: 10.1155/2011/293060.
- Oh, J. M., Jang, H., Kang, M., Song, S., Kim, D., Kim, J., Noh, J., Park, J. E., Park, D., Yee, S. & Kim, H. (2021). Acetylcholinesterase and Monoamine Oxidase-B Inhibitory Activities by Ellagic Acid Derivatives Isolated from *Castanopsis cuspidata* var. Sieboldii. *Scientific Reports*, 11 (13953): 1-15. DOI: 10.1038/s41598-021-93458-4.
- Maurya, A., Kalani, K., Verma, S. C., Singh, R. & Srivastava, A. (2018). Vacuum Liquid Chromatography: Simple, Efficient and Versatile Separation Technique for Natural Products. *Organic and Medicinal Chemistry International Journal*, 7 (2): 1-3. DOI: 10.19080/OMCIJ.2018.07.555710
- Nakamura, M., Ra, J-H., Jee, Y. dan Kim, J-S. (2017). Impact of Different Partitioned Solvents on Chemical Composition and Bioavailability of *Sasa quelpaertensis* Nakai leaf extract. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25 (2): 316-326. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.08.006>.
- Pamungkas, A. & Indrayudha, P. (2019). Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol, Fraksi Etanol-Air, Etil Asetat serta N-Heksana Buah Pare (*Momordica charantia*) pada Sel MCF-7 secara In-Vitro. *Pharmacon: Jurnal Farmasi Indonesia*, 16 (2): 73-82. DOI: 10.23917/pharmacon.v16i2.9049
- Pearce, A., Haas, M., Viney, R., Pearson, S. A., Haywood, P., Brown, C. & Wars, R. (2017). Incidence and Severity of Self-reported Chemotherapy Side Effects in Routine Care: A Prospective Cohort Study. *PLOS ONE*, 12 (10): e0184360. DOI: 10.1371/journal.pone.0184360.
- Priyadi, M., Haryoto, H., Anggraeni, A. D. & Khong, H. Y. (2021). Phytochemical and Cytotoxic Test of *Durio kutejensis* Root Bark on MCF-7 Cells. *Borneo Journal of Pharmacy*, 4 (1): 1-5. DOI: <https://doi.org/10.33084/bjop.v4i1.1443>
- Razak, N. A., Abu, N., Ho, W. Y., Zamberi, N. R., Tan, S. W., Alitheen, N. B., Long, K. & Yeap, S. K. (2019). Cytotoxicity of Eupatorin in MCF-7 and MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells via Cell Cycle Arrest, Anti-angiogenesis and Induction of Apoptosis. *Scientific Reports*, 9 (1514): 1-12. DOI: 10.1038/s41598-018-37796-w.

- Rodrigues, M-A. (2021). Principles of Radiation Therapy in Breast Cancer. In: Breast Cancer and Gynecologic Cancer Rehabilitation, Cristian, A., Elsevier, St Frisco, pp: 89-97. DOI: <https://doi.org/10.1016/C2018-0-03237-5>.
- Sharma, M., Grewal, K., Jandrotia, R., Batish, D. R., Singh, H. P. & Kohli, R. K. (2022). Essential Oils as Anticancer Agents: Potential Role in Malignancies, Drug Delivery Mechanisms, and Immune System Enhancement. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 146: 112514. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112514.
- Sianipar, N. F., Maarisit, W. & Valencia, A. (2013). Toxic Activities of Hexane Extract and Column Chromatography Fractions of Rodent Tuber Plant (*Typhonium flagelliforme* Lodd.) on Artemia Salin. *Indonesian Journal of Agricultural Science*, 14 (1): 1-6. DOI: 10.21082/ijas.v14n1.2013.p1-6.
- Striegel, M. & Hill, J. (1996). *Thin Layer Chromatography for Binding Media Analysis. The Getty Conversation Institute*. Los Angeles. P. 25-28.
- Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M. & Jemal, A. (2016). Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 25 (1): 16–27. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-15-0578.
- Tuyen, P. T., Khang, D. T., Minh, T. H., Minh, T. N., Ha, P. T. T., Elzaawely, A. A. & Xuan, T. D. (2016). Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Castanopsis phuthoensis* and *Castanopsis grandicaticata*. *International Letters of Natural Sciences*, 55: 77-87. DOI: 10.18052/www.scipress.com/ILNS.55.77.
- Verma, N. & Shukla, S. (2015). Impact of Various Factors Responsible for Fluctuation in Plant Secondary Metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2: 105–113. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2015.09.002>.
- Wakeel, A., Jan, S. A., Ullah, I., Shinwari, Z. K. dan Xu, M. (2019). Solvent Polarity Mediates Phytochemical Yield and Antioxidant Capacity of *Isatis tinctoria*. *Peer Journal*, 7: e7857. DOI: 10.7717/peerj.7857
- WHO (World Health Organization). (2022). Cancer. <https://www.who.int/health-topics/cancer>. (Diakses pada 7 Maret 2022).
- Yang, Y., Luo, X., Wei, W., Fan, Z., Huang, T. & Pan, X. (2020). Analysis of Leaf Morphology, Secondary Metabolites and Proteins related to the Resistance to *Tetranychus cinnabarinus* in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Scientific Reports*, 10 (14197): 1-13. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70509-w>.
- Zhang, Q. W., Lin, L. G. & Ye, W. C. (2018). Techniques for Extraction and Isolation of Natural Products: A Comprehensive Review. *Chinese Medicine*, 13 (20): 1-26. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>