

EKSTRAK ETANOLIK DAUN AWAR-AWAR (*Ficus septica* Burm. f.) MEMACU APOPTOSIS SEL KANKER PAYUDARA MCF-7 MELALUI PENEKANAN EKSPRESI Bcl-2

AWAR-AWAR (*Ficus septica* Burm. f.) LEAVES ETHANOLIC EXTRACT INDUCED APOPTOSIS OF MCF-7 CELLS BY DOWNREGULATION OF Bcl-2

**Dewi Arum Sekti, Muhammad Fithrul Mubarak, Inna Armandani, Sedy Junedy dan
Edy Meiyanto*)**

Cancer Chemoprevention Reserach Center
Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRAK

Alkaloid fenantroindolisidin memiliki aktivitas sitotoksik terhadap beberapa sel kanker. Ekstrak etanolik daun Awar-awar terbukti mampu meningkatkan aktivitas sitotoksik agen kemoterapi doxorubicin pada sel MCF-7. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak etanolik daun Awar-awar (*Ficus septica* Burm. f.) terhadap pemacuan apoptosis sel kanker payudara MCF-7. Serbuk daun Awar-awar diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan etanol 70% kemudian dipekatkan untuk memperoleh ekstrak etanolik daun Awar-awar. Penelusuran mekanisme molekuler efek sitotoksik ekstrak etanolik daun Awar-awar dilakukan dengan pengamatan apoptosis dengan metode double staining dan ekspresi protein Bcl-2 dengan metode imunositokimia. Pengamatan apoptosis dan ekspresi protein Bcl-2 pada aplikasi tunggal ekstrak daun Awar-awar menunjukkan kemampuan ekstrak menginduksi apoptosis dan menurunkan ekspresi protein Bcl-2. Hasil penelitian membuktikan bahwa ekstrak etanolik daun Awar-awar berpotensi untuk sebagai agen ko-kemoterapi.

Kata kunci : Daun Awar-awar (*F. septica* Burm. f.), sel MCF-7, apoptosis, Bcl-2

ABSTRACT

Alkaloid fenantroindolisidin showed cytotoxic activity against several cancer cells. Ethanolic leaf extract of Awar-awar proven to increase the cytotoxic activity of chemotherapy agent doxorubicin in MCF-7 cells. This study aims to determine the effect of Ethanolic leaf extract of Awar-awar in apoptosis induction of breast cancer cells MCF-7. Awar-awar leaf powder was extracted by maceration using 70% ethanol and then concentrated to obtain concentrated of Awar-awar. Apoptosis induction was examined by double staining method and the expression of Bcl-2 protein was observed by immunohistochemistry method. Single treatment of Awar-awar leaf extract showed the ability of extracts to induce apoptosis and downregulated the expression of Bcl-2 protein. Ethanolic leaf extract of Awar-awar is potential as co-chemotherapeutic agent.

Key words : Awar-awar (*F. septica* Burm. f.), MCF-7 cells, apoptosis, Bcl-2

PENDAHULUAN

Pengobatan kanker payudara dengan cara kemoterapi merupakan pilihan potensial yang banyak dipilih oleh penderita kanker di Indonesia. Akan tetapi, pengobatan kanker menggunakan

sebagian besar kegagalan pengobatan kanker (Staerk *et al.*, 2002). Eksplorasi agen kemopreventif merupakan alternatif upaya untuk meningkatkan daya sitotoksik suatu agen kemoterapi terhadap sel kanker dan mengurangi efek samping agen kemoterapi.

*) korespondensi: Prof. Dr. Edy Meiyanto, M.Si., Apt
Cancer Chemoprevention Research Center (CCRC),
Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada
e-mail:edy.meiyanto@gmail.com

agen kemoterapi cenderung menimbulkan resistensi sel kanker yang mengakibatkan

Sel kanker memiliki kemampuan proliferasi sel yang tinggi dan kemampuan untuk menghindari program bunuh diri sel (apoptosis) (Manikdanan *et al.*, 2007). Jalur intrinsik apoptosis melibatkan protein *pro* dan *anti-apoptotic* melalui pengaturan permeabilitas membran mitokondria.

Protein yang termasuk dalam keluarga proapoptosis adalah Bax, Bak, dan Bok sedangkan yang termasuk protein antiapoptosis adalah Bcl-2 dan Bcl-XL (Padanilam, 2003). Protein proapoptosis (Bax, Bak, Bok) dapat menginduksi pelepasan sitokrom C yang bersama Apaf-1 menginduksi apoptosis melalui aktivasi caspase (Padanilam, 2003). Pengaturan apoptosis (terjadi induksi atau blok) tergantung rasio relatif dari keluarga Bcl-2 dan dimerisasinya. Homodimer Bcl-2 akan menghambat apoptosis sedangkan homodimer Bax akan menginduksi apoptosis (King, 2000).

Tanaman Awar-awar (*Ficus septica* Burm. f.) mengandung alkaloid fenantroindolisidin yang berpotensi sebagai agen kemopreventif (Staerk *et al.*, 2002). Aktivitas sitotoksik komponen fenantroindolisidin menunjukkan nilai poten yang tinggi pada *cell lines carcinoma* KB-VI (*multidrug resistance cell*) dan KB-3-1 (*sensitive cell*). Salah satu komponen fenantroindolisidin berupa 6-*O*-desmethylantofine dari *Tylophora tanakae* mempunyai IC_{50} 7 ± 3 nM untuk sel KB-3-1 dan IC_{50} 10 ± 4 nM untuk sel KB-VI (Staerk *et al.*, 2002). *Ficus septica* Burm. f. terbukti mengandung alkaloid fenantroindolisidin yang mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker nasofaring HONE-1 dan sel kanker lambung NUGC (Damu *et al.*, 2005). Ekstrak etanolik daun *F. septica* terbukti memberikan efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dengan IC_{50} 58,58 μ g/ml (Nurchaya, 2007). Pada penelitian terbaru juga terbukti bahwa ekstrak etanolik daun Awar-awar memiliki efek sitotoksik terhadap sel MCF-7 dengan nilai IC_{50} = 6 μ g/mL (Mubarok *et al.*, 2008). Selain itu ekstrak etanolik daun Awar-awar juga mampu meningkatkan aktivitas sitotoksik doxorubicin terhadap sel MCF-7 (Mubarok *et al.*, 2008).

Penelitian ini dilakukan untuk mengamati mekanisme molekuler yang memperantarai aktivitas sitotoksik ekstrak Awar-awar pada sel MCF-7 melalui pengamatan induksi apoptosis dan pengaruh terhadap ekspresi protein Bcl-2. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar pengembangan terapi kombinasi agen kemoterapi dan agen kemopreventif dari bahan alami daun Awar-awar. Dengan demikian diharapkan prevalensi kegagalan pengobatan kanker dapat menurun dan dapat meningkatkan kualitas hidup masyarakat.

METODOLOGI

Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran dan Laboratorium Farmakognosi bagian Biologi

Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada pada bulan Januari 2008 - November 2008.

Bahan Penelitian

Ekstrak etanolik daun Awar-awar (*F. septica*) yang diperoleh dengan jalan remaserasi dalam etanol 70% (Merck) serbuk kering daun yang diperoleh dari daerah Kalasan, Sleman. Sel kanker payudara MCF-7 diperoleh dari koleksi *Cancer Chemoprevention Research Center*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Bahan kimia lainnya yang digunakan yakni: media penumbuh DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) (Gibco) yang mengandung *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% v/v (Gibco) dan penisillin-streptomisin 1 % v/v (Gibco), PBS (*Phosphate buffer Saline*), Tripsin-EDTA 2,5 %, SDS 10%, Pelarut DMSO (Sigma), *100X Stock Solution* yang mengandung 50 mg etidium bromide (Sigma) dan 15 mg akridin oranye (Sigma) yang dilarutkan dalam 1 ml etanol 70% (Merck) dan selanjutnya ditambah akuades 49 ml, *1X Working Solution* yang mengandung 1 ml *100X Stock solution* yang diencerkan menjadi 1/100 dalam *Phosphat Buffer Saline* (PBS), Formalin (Merck), antibodi primer Bcl-2 (Dako), dan akuades.

Prosedur Penelitian

Pengamatan Apoptosis

Sel MCF-7 dengan kepadatan 5×10^4 sel/sumuran, ditanam pada *coverslips* dalam *plate* 24 (Nunc) sampai 50-60 % konfluen. Setelah itu, *plate* tersebut diberi perlakuan senyawa uji dan selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37 °C selama 48 jam. Selanjutnya, medium diambil dan *plate* yang berisi sel dicuci dengan PBS. *Cover slip* (Nunc) yang memuat sel diangkat, lalu diletakkan diatas objek glass. Kemudian, pada *cover slip* tersebut ditambahkan 10 μ l *1X Working Solution* akridin oranye-etidium bromida (AO - Et-Br) (Sigma), dan didiamkan selama 5 menit. Selanjutnya, *cover slip* segera diamati di bawah mikroskop fluoresensi (Zeiss MC 80) dan didokumentasikan dengan kamera digital (Canon Power Shoot A460, 5,0 mega pixels). Sel hidup akan berfluoresensi hijau (dengan akridin oranye) dan sel mati akan berfluoresensi oranye (dengan etidium bromida) (Wickenden *et al.*, 2003).

Pengamatan ekspresi protein dengan immunositokimia

Sel MCF-7 dengan kepadatan 5×10^4 sel/sumuran ditanam pada *cover slips* (Nunc) dalam *plate* 24 (Nunc) sampai 80 % konfluen. Setelah itu, *plate* tersebut diberi perlakuan senyawa uji dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37 °C selama 15 jam. Selanjutnya, medium diambil dan *plate* yang berisi sel dicuci dengan

PBS. Selanjutnya, sel difiksasi dengan formalin 4% selama 20 menit, lalu dicuci PBS, dan dilanjutkan dengan dehidrasi masing-masing selama 5 menit menggunakan etanol konsentrasi bertingkat yaitu 50, 70 dan 95%. *Cover slip* (Nunc) yang memuat sel diangkat dan diletakkan di atas dish (Nunc) 6 cm. Kemudian, dilakukan pengecatan imunositokimia dengan menggunakan antibodi spesifik Bcl-2 dan diamati pada mikroskop cahaya dan didokumentasikan dengan kamera digital (Canon Power Shoot A460, 5,0 mega pixels).

Analisis hasil

Pengamatan Apoptosis

Pengamatan apoptosis dilakukan menggunakan mikroskop fluoresens. Sel hidup akan tampak normal dan berfluoresensi hijau. Sel yang apoptosis awal akan tampak kondensasi dan berfluoresensi hijau. Sel yang apoptosis akhir akan tampak kondensasi dan berfluoresensi merah. Sel yang nekrosis akan tampak normal dan berfluoresensi merah.

Pengamatan Ekspresi Protein

Ekspresi protein diamati menggunakan mikroskop cahaya. Sel yang mengekspresikan protein tertentu akan memberikan warna coklat/gelap, sedangkan yang tidak mengekspresikan protein tertentu memberikan warna transparan kebiruan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian sebelumnya, ekstrak etanolik daun Awar-awar dan doxorubicin menunjukkan efek sitotoksik terhadap sel MCF-7 dengan parameter kadar sampel uji yang dapat menghambat pertumbuhan sel sampai 50% (IC_{50}) masing-masing sebesar 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan 328 nM (Mubarok *et al.*, 2008). Selain itu kombinasi ekstrak etanolik daun Awar-awar dengan doxorubicin juga mampu meningkatkan efek sitotoksik doxorubicin tunggal (Mubarok *et al.*, 2008). Tingginya potensi sitotoksik daun Awar-awar ini kemungkinan disebabkan oleh kemampuan yang kuat dalam memacu apoptosis sel MCF-7.

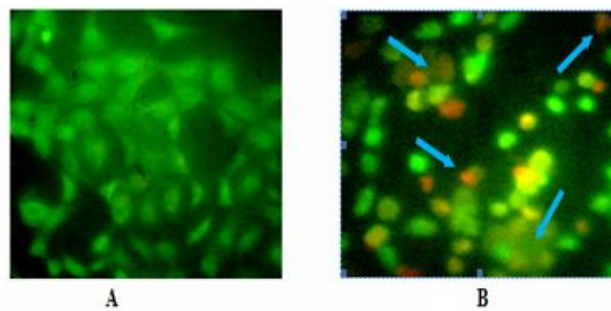
Pengamatan apoptosis ekstrak etanolik daun Awar-awar (*Ficus septica* Burm. f.)

Pengamatan apoptosis sel MCF-7 dilakukan dengan menggunakan ekstrak etanolik daun Awar-awar dalam aplikasi tunggal. Pengamatan ini bertujuan untuk melihat ada tidaknya apoptosis pada sel MCF-7 setelah perlakuan. Hasil penelitian dengan metode *double staining* dengan akridin oranye dan Et-Br menunjukkan bahwa ekstrak pada konsentrasi IC_{50} 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mampu menginduksi apoptosis pada sel MCF-7 dengan indikasi adanya sel yang berwarna oranye pada sel uji. Sel normal berwarna hijau karena membran sel masih utuh sehingga Et-Br tidak bisa masuk ke dalam sel, ketika sel mengalami apoptosis maka Et-Br dapat masuk dan sel terfragmentasi menjadi berfluoresensi oranye kemerahan (McGahon *et al.*, 1995).

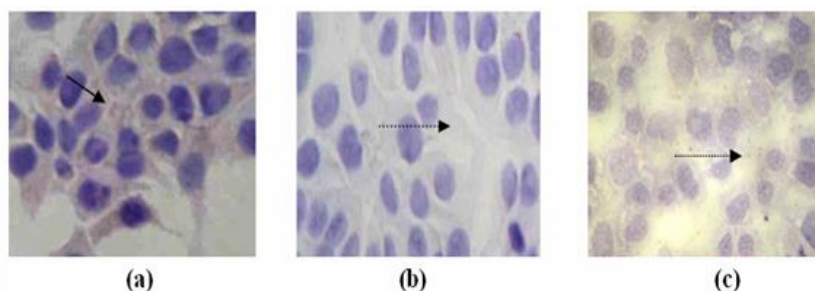
Pengamatan ekspresi protein Bcl-2

Pengamatan ekspresi protein regulator apoptosis Bcl-2 pada sel MCF-7 dengan ekstrak etanolik daun Awar-awar menggunakan metode imunositokimia dengan prinsip pengikatan antibodi spesifik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak mampu menurunkan ekspresi Bcl-2 pada sel MCF-7. Gambar 2 secara visual menunjukkan bahwa sitoplasma sel perlakuan uji mempunyai warna biru berbeda signifikan dengan kontrol sel dengan antibodi spesifik Bcl-2 yang berwarna coklat. Pada penelitian digunakan kontrol sel tanpa antibodi spesifik yang berwarna biru sebagai pembanding Bcl-2 tidak terdeteksi ekspresinya karena tidak ada antibodi spesifik Bcl-2 yang mengenalinya.

Ekstrak etanolik daun *F. septica* dapat menginduksi apoptosis pada sel kanker payudara MCF-7. Fenomena apoptosis dengan metode *double staining* menggunakan AO-EtBr dapat diamati secara teoritis, dimana fase *early* apoptosis berfluoresensi hijau kekuningan dan *late* apoptosis berfluoresensi oranye kemerahan dengan inti terang dan badan sel terfragmentasi sedangkan pada sel normal berfluoresensi hijau.



Gambar 1. Pengamatan apoptosis pada aplikasi tunggal ekstrak etanolik daun Awar-awar. Sel MCF-7 dengan kepadatan 5×10^4 sel/sumuran, ditanam pada *coverslips* dalam *plate* 24 sampai 50-60 % konfluen. Setelah itu, *plate* tersebut diinkubasi dengan senyawa uji IC_{50} $6 \mu\text{g/mL}$ selama 48 jam. Selanjutnya, pengecatan (*double staining*) dilakukan dengan AO - Et-Br. (A) Kontrol sel MCF-7, (B) aplikasi tunggal IC_{50} ekstrak.



Gambar 2. Pengamatan ekspresi protein Bcl-2 pada sel MCF-7 dengan aplikasi tunggal ekstrak etanolik daun Awar-awar.

Sel MCF-7 dengan kepadatan 5×10^4 sel/sumuran ditanam pada *coverslips* dalam *plate* 24 sampai 80 % konfluen. Setelah itu, *plate* tersebut diinkubasi dengan senyawa uji selama 15 jam kemudian dilakukan pengecatan imunositokimia Bcl-2. Hasil pengamatan dibawah mikroskop cahaya. (a). Kontrol sel dengan antibodi spesifik (b). Kontrol sel tanpa antibodi spesifik (c). Sel dengan inkubasi dengan ekstrak konsentrasi IC_{50} $6 \mu\text{g/mL}$.

Kerusakan membran akibat terjadinya apoptosis menyebabkan fluoresensi hijau normal menjadi pudar dan berwarna oranye kemerahan karena etidium bromida telah mampu masuk ke dalam sel.

Penelusuran jalur apoptosis pada penelitian ini melalui pengamatan ekspresi Bcl-2 yang didapati menurun akibat perlakuan ekstrak dengan warna sitoplasma biru. Protein proapoptosis (Bax, Bak, Bok) dapat menginduksi pelepasan sitokrom C yang bersama Apaf-1 menginduksi apoptosis melalui aktivasi caspase, namun keberadaan Bcl-2 sebagai protein antiapoptosis beraksi kebalikan (Padanilam, 2003). Hal ini semakin meyakinkan bahwa ekstrak etanolik daun Awar-awar berpotensi sebagai agen ko-kemoterapi yang dapat meningkatkan aktivitas sitotoksik sel kanker payudara terhadap agen kemoterapi melalui pemacuan apoptosis dengan jalur menurunkan ekspresi protein Bcl-2.

Protein Bcl-2 merupakan salah satu jenis protein anti apoptosis yang terlibat dalam proses

apoptosis. NF κ B dari *downstream* PI3K/Akt merupakan faktor transkripsi yang penting dalam transkripsi protein antiapoptosis seperti Bcl-2, IAP dan Bcl-XL (Simstein *et al.*, 2003). Terjadinya penghambatan jalur PI3K/ Akt/NF κ B dapat menekan ekspresi protein Bcl-2. Keberadaan ekstrak etanolik daun *F. septica* dapat menurunkan ekspresi protein Bcl-2, namun penurunan ekspresi tidak terlihat tajam dibanding dengan kontrol sel.

Adanya aktivitas sitotoksik ekstrak etanolik daun *F. septica* dengan nilai poten yang tinggi serta kemampuan ekstrak etanolik daun *F. septica* menurunkan overekspresi protein Bcl-2 menunjukkan bahwa sel kanker payudara MCF-7 tidak resisten terhadap ekstrak etanolik daun *F. septica*. Penekanan ekspresi protein Bcl-2 dapat menyebabkan terjadinya induksi apoptosis karena pelepasan sitokrom c oleh mitokondria menjadi tidak terhambat yang selanjutnya dapat mengaktifasi jalur caspase. Adanya delesi gen *CASP-3* menyebabkan MCF-7 mengalami

apoptosis melalui aktivasi sekuen caspase 6 dan 7 dan tidak melalui caspase 3 (Liang *et al.*, 2001).

Proses apoptosis tetap terlihat ada, meskipun penekanan ekspresi protein Bcl-2 oleh ekstrak etanolik daun *F. septica* masih rendah. Apoptosis yang terjadi kemungkinan juga melibatkan adanya peningkatan ekspresi protein pro apoptosis seperti Bad, Bax, Bak (Ricci *and* Zong, 2006). Oleh karena itu, masih membutuhkan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanolik daun *F. septica* terhadap ekspresi protein pro apoptosis (Bax dan Bak). Pengembangan penelitian diarahkan untuk mengembangkan ekstrak etanolik daun *F. septica* menjadi sediaan fitofarmaka sebagai agen kemopreventif yang efektif, aman dan aplikatif dimasyarakat.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, menunjukkan bahwa ekstrak etanolik daun Awar-awar (*Ficus septica* Burm.f.) mampu menginduksi apoptosis pada sel MCF-7 melalui penekanan ekspresi Bcl-2.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan oleh penulis kepada DP2M DIKTI 2008 yang telah membantu mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Damu, Amooru G., Kuo, Ping-Chung, Shi, Lian Shi, Li, Chia-Ying, Kuoh, Chang-Sheng, Wu, Pei-Lin, Wu, and Tian-Shung, 2005, Phenanthroindolizidine Alkaloids from The Stems of *Ficus septica*, *J. Nat. Prod.*, **68**, 1071-1075.
- King, R.J.B., 2000, *Cancer Biologi*, 2nd edition, 5, Pearson Education Limited, London.
- Liang, Y., Yan, C., and Schor, N.F., 2001, Apoptosis in The Absence of Caspase 3, *Oncogene*, **20**, 6570-6578.
- Manikdanan P., Vidjaya Letchoumy P., Prathiba D., and Nagini S., 2007, Proliferation, angiogenesis dan apoptosis-associated proteins are molecular targets for chemoprevention of MNNG-induced gastric carcinogenesis by ethanolic *Ocimum sanctum* leaf extract, *Singapore Med J*, **48** (7), 645-651.
- McGahon, A. J., Martin, S. J., Bissonnette, R. P., Mahboubi, M., Shi, Y., Mogil, R. J., Nishioka, W. K., and Green, D. R., 1995, The End of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis in Vitro, Cell Death, *Academic Press*, San Diego.
- Mubarok M.F., Sekti Dewi A., and Ainun W., 2008, Peningkatan Aktivitas Sitotoksik Doxorubicin terhadap Sel MCF-7 menggunakan Ekstrak Etanolik Daun Awar-awar (*Ficus septica* Burm. f.), *Prosiding KONGRES ILMIAH XVI ISFI 2008*. ISBN : 978-979-95107-6-2. Penerbit : Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia
- Nurchaya, B. M., 2007, Efek Antiproliferatif Ekstrak Etanolik Daun Awar-Awar (*Ficus septica* Burm. f.) terhadap Sel Kanker Payudara T47D, *Skripsi*, Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta
- Padanilam, B.J., 2003, Cell Death Induced by Acute Renal Injury: A Perspective on the Contributions of Apoptosis dan Necrosis, *Am J Physiol Renal Physiol*, **284**, F608-F627.
- Ricci, M.S. and Zhong, W.X., 2006, Chemotherapeutic Approaches for Targeting Cell Death Pathways, *The Oncologist*, **11**, 342-357.
- Simstein, R., Burow, M., Parker, A., Weldon, C., and Beckman, B., 2003, Apoptosis, Chemoresistance and Breast Cancer : Insights from the MCF-7 Cell Model System, *Exp.Biol.Med.*, **228**, 995-1003.
- Staerk, D, Lykkeberg, A.K, Christensen, J, Budnik, B.A., Abe, F. and Jaroszewski, J.W., 2002, In Vitro Cytotoxic Activity of Phenanthroindolizidine Alkaloids from *Cynanchum vincetoxicum* dan *Tylophora tanakae* against Drug-Sensitive dan Multidrug Resistant Cancer Cells, *J. Nat. Prod.*, **65**, 1299-1302.