



## Anticancer activity of ethanol extract, n-hexane, and the ethyl acetate fraction of tin leaves (*Ficus carica* L.) on MCF-7 breast cancer cell lines

### Aktivitas antikanker ekstrak etanol, fraksi n-heksan, dan etil asetat daun tin (*Ficus carica* L.) pada sel kanker payudara MCF-7

Aji Winanta\*, Widhi Yana Sari

Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

\*Corresponding author: [ajiwinnanta@umy.ac.id](mailto:ajiwinnanta@umy.ac.id)

#### Abstract

**Background:** Breast cancer is ranked as the second-highest cause of death in Indonesia. Many of the available cancer treatments result in severe adverse effects for patients. Tin (*Ficus carica* L.) leaves contain ingredients that can function as anticancer agents.

**Objective:** The study aims to identify phytochemical secondary metabolites in tin leaves and the cytotoxic activity of the extract and tin leaf fraction on MCF-7 cells.

**Method:** Tin leaf powder was macerated with 70% ethanol for 7 days. The extracts were fractionated using n-hexane and ethyl acetate. An identification test with ethanol extract was then carried out using spray reagents. The cytotoxic activity of ethanolic extract, n-hexane and ethyl acetate fraction of tin leaf was determined using the MTT method.

**Result:** The results of the identification with TLC found that the ethanol extract of tin leaves contains flavonoids and steroids. The ethyl acetate fraction of tin leaf was thought to have weak cytotoxic properties with an IC<sub>50</sub> value of 274.5877 µg / mL while the ethanol extract and n-hexane fraction of tin leaf do not have cytotoxic properties because they have an IC<sub>50</sub> value of 562.827 and 576.3552 µg / mL.

**Conclusion:** Based on the results, tin leaves have the potency to be developed as a chemopreventive agent for MCF-7 breast cancer cells.

**Keywords:** Breast Cancer, MCF-7 cells, tin leaf (*Ficus carica*), cytotoxic activity

#### Intisari

**Latar belakang:** Kanker payudara menduduki peringkat kedua penyebab kematian tertinggi di Indonesia. Dari beberapa pilihan pengobatan kanker yang tersedia, sering kali menimbulkan efek samping yang berat bagi pasien sehingga penemuan agen kemopreventif yang alami dan aman masih terus berlangsung hingga sekarang. Salah satu bahan alam yang memiliki potensi sebagai agen kemopreventif yaitu tanaman tin (*Ficus carica* L.) memiliki kandungan yang dapat berfungsi sebagai antikanker.

**Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak etanol dan fraksi-fraksi daun tin dan efek sitotoksiknya terhadap sel MCF-7.

**Metode:** Serbuk daun tin dimaserasi dengan alkohol 70% selama 7 hari. Dari hasil ekstrak yang didapat kemudian dilakukan fraksinasi dengan menggunakan n-heksan dan etil asetat. Uji identifikasi senyawa flavonoid dan steroid dari ekstrak etanol dilakukan dengan menggunakan pereaksi Liebermen-Burchard dan uap amoniak serta uji sitotoksik dengan menggunakan metode MTT terhadap sel MCF-7.

**Hasil:** Hasil identifikasi dengan KLT didapatkan bahwa ekstrak etanol daun tin mengandung senyawa metabolit sekunder berupa flavonoid dan steroid. Fraksi etil asetat daun tin memiliki efek sitotoksik yang cukup toksik dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 274,58 µg/mL sedangkan ekstrak etanol dan fraksi n-heksan daun tin tidak memiliki efek sitotoksik karena memiliki nilai IC<sub>50</sub> sebesar 562,82 dan 576,35 µg/mL.

**Kesimpulan:** Berdasarkan hasil penelitian fraksi etil asetat daun tin memiliki potensi untuk diteliti lebih lanjut dalam upaya pengembangan sebagai agen kemopreventif terhadap sel kanker payudara MCF-7.

**Kata kunci:** Kanker payudara, sel MCF-7, daun tin (*Ficus carica*), aktivitas sitotoksik

## 1. Pendahuluan

Jumlah penderita kanker meningkat secara signifikan baik di Indonesia maupun di seluruh dunia. Kanker payudara berada di peringkat pertama kasus kanker baru dan penyebab kematian akibat kanker kedua di Indonesia. Berdasarkan data proyek *Global Cancer Statistic* (GLOBOCAN) dari *International Agency for Research on Cancer* (IARC) (Bray *et al.*, 2018), sebanyak 58 ribu kasus kanker payudara baru ditemukan di Indonesia dan 22 ribu jiwa diantaranya meninggal dunia. Upaya pengobatan kanker dapat dilakukan dengan berbagai macam seperti pembedahan, kemoterapi, radiasi, dan pemberian terapi hormonal (Nakano *et al.*, 2010). Namun metode ini tidak cukup efektif dalam pengobatan kanker dikarenakan sulitnya mendesain senyawa kemoterapi yang memiliki aktifitas antikanker tinggi namun rendah efek sampingnya pada sel normal (Gibbs, 2000).

Penemuan agen kemopreventif yang alami dan aman masih terus berlangsung hingga sekarang. Salah satu bahan alam yang memiliki potensi sebagai agen kemopreventif yaitu tanaman tin (*Ficus carica* L). Bagian tanaman tin yang telah digunakan secara empiris sebagai antikanker dan antioksidan adalah daunnya. Kandungan fitokimia dari tanaman tin seperti flavonoid, terpenoid, polifenol, alkaloid, dan tanin (Joseph & Raj, 2010; Anisa *et al.*, 2018), merupakan senyawa penting yang diduga berperan sebagai senyawa antikanker. Flavonoid memiliki aktivitas sebagai antiproliferasi sel, menginduksi apoptosis dan antioksidan (Soni *et al.*, 2014), kandungan  $\beta$ -sitosterol dalam buah dan daun tin telah teruji secara *in vitro* dapat menghambat proliferasi berbagai sel kanker (Joseph & Raj, 2010).

Beberapa penelitian aktivitas antikanker dari tanaman tin telah dilakukan. Ekstrak etanol daun tin mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker HeLa dengan nilai  $IC_{50}$  150  $\mu$ g/mL (Refli, 2012). Penelitian Zubair *et al.* (2015) menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat dari buah tin mampu menghambat proliferasi sel MCF-7 dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 9,8  $\mu$ g/mL. Berdasarkan hal tersebut peneliti ingin mengetahui kandungan metabolit sekunder yang terkandung dalam daun tin (*Ficus carica* L), serta mengetahui aktivitas antikanker pada sel kanker MCF-7 secara *in vitro*.

## 2. Metode

### 2.1 Deskripsi bahan dan teknik pengumpulan sampel

Daun tin (*Ficus carica* L.) diperoleh dari Magelang, Jawa Tengah, diekstraksi dengan etanol 70% dan difraksinasi menggunakan pelarut etanol 96%, n-heksan dan etil asetat. Bahan yang digunakan untuk menguji kandungan kima yaitu silika gel GF-254, asam asetat, n-butanol (Merck), kloroform (Merck), metanol (Merck), amoniak, Lieberman Burchard. Sel kanker payudara MCF-7

diperoleh dari koleksi Laboratorium Kultur Sel Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UMY. Media, sel MCF-7 ditumbuhkan dalam media Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) yang mengandung Foetal Bovine Serum (FBS) 10% (v/v) (Glibco), penisilin-streptomisin 1% (v/v) (Glibco).

## 2.2 Jalannya penelitian

### 2.2.1 Ekstraksi dan fraksinasi

Sebanyak 500 gram serbuk kering daun tin dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:6 selama 5 hari, kemudian diremaserasi dengan perbandingan pelarut yang sama selama 2 hari. Ekstrak cair yang didapatkan kemudian dievaporasikan pada suhu 60°C dan dipanaskan diatas *waterbath* dengan suhu 70°C. Fraksinasi dilakukan dengan melarutkan 10 gram ekstrak kasar dengan 50 mL pelarut air:etanol 2:3 hingga larut sempurna. Larutan kemudian difraksinasi dengan menggunakan n-heksan dan etil asetat dengan perbandingan 1:1. Proses ini diulang sebanyak tiga kali (Tusanti *et al.*, 2014; Phang *et al.*, 2013).

### 2.2.2 Identifikasi senyawa menggunakan metode KLT

Pada penelitian ini digunakan fase diam berupa silika gel GF-254 nm sedangkan fase gerak digunakan sesuai dengan senyawa yang ingin diidentifikasi keberadaannya. Identifikasi senyawa yang dilakukan pada penelitian ini yaitu identifikasi flavonoid, dan steroid. Pada identifikasi flavonoid digunakan fase gerak berupa butanol:asam asetat:air (3:1:1). Identifikasi steroid digunakan fase gerak berupa kloroform:metanol (9:1). Bercak diamati dengan menggunakan sinar tampak, UV 256 nm dan UV 366 nm.

### 2.2.3 Uji sitotoksik dengan metode MTT

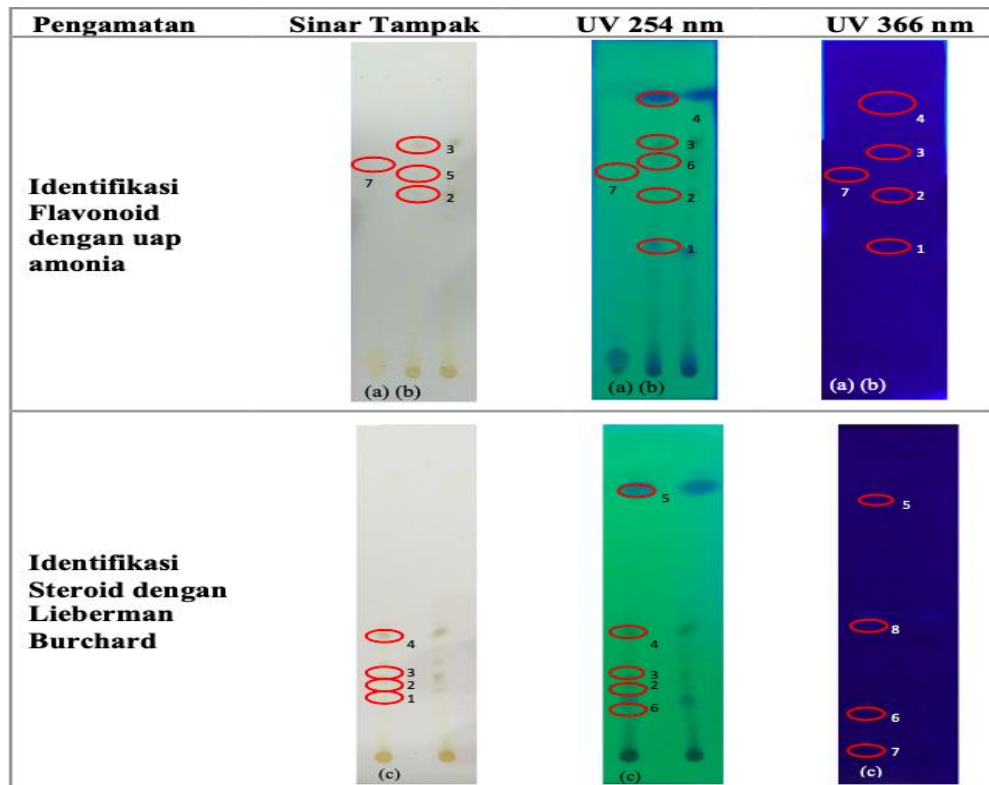
Sel dengan kepadatan  $1 \times 10^4$  sel/sumuran didistribusikan ke dalam *plate* 96 sumuran dan diinkubasi selama 48 jam untuk beradaptasi dan menempel di dasar sumuran, kemudian media diambil, dicuci PBS dan ditambahkan 100  $\mu$ L media kultur yang mengandung DMSO 0,2% (kontrol), sampel uji dalam bentuk tunggal (ekstrak dan fraksi-fraksi daun tin) diinkubasi selama 48 jam. Pada akhir inkubasi, media kultur yang mengandung sampel dibuang, dicuci dengan 100  $\mu$ L PBS. Kemudian ke dalam masing masing sumuran ditambahkan 100  $\mu$ L media kultur yang mengandung 5 mg/mL MTT, diinkubasi lagi selama 4 jam pada suhu 37°C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan berwarna ungu. Setelah 4 jam, media yang mengandung MTT dibuang, dicuci PBS kemudian ditambahkan larutan *stopper* SDS dalam HCl 0,1% 200  $\mu$ L untuk melarutkan

kristal formazan, dikocok di atas shaker selama 10 menit kemudian dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm. Aktivitas sitotoksik dihitung dengan melihat nilai % sel hidup dan nilai IC<sub>50</sub> dihitung melalui persamaan regresi linier (Riss *et al.*, 2013; Febriansah *et al.*, 2014). Morfologi sel MCF-7 diamati dibawah mikroskop inverter dan memberikan gambaran sel yang awalnya berbentuk bulat (sel kanker MCF-7) menjadi tak beraturan (setelah pemberian perlakuan sampel). Rumus menghitung sel hidup:

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

### 3. Hasil dan pembahasan

Berdasarkan hasil ekstraksi dari 500 g serbuk kering daun tin diperoleh nilai rendemen ekstrak etanol yaitu sebesar 84,85 g (16,7%). Sedangkan hasil rendemen fraksi etil asetat dan n-heksan daun tin diperoleh hasil masing-masing sebesar 41,4% dan 36,9%. Untuk memastikan apakah terdapat kandungan flavonoid dan steroid pada ekstrak dan fraksi daun tin maka dilakukan dengan uji KLT. Hasil uji KLT menunjukkan adanya bercak berwarna yang dapat diamati pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Profil KLT ekstrak etanol daun tin (a), pembanding rutin (b), dan (c) ekstrak etanol

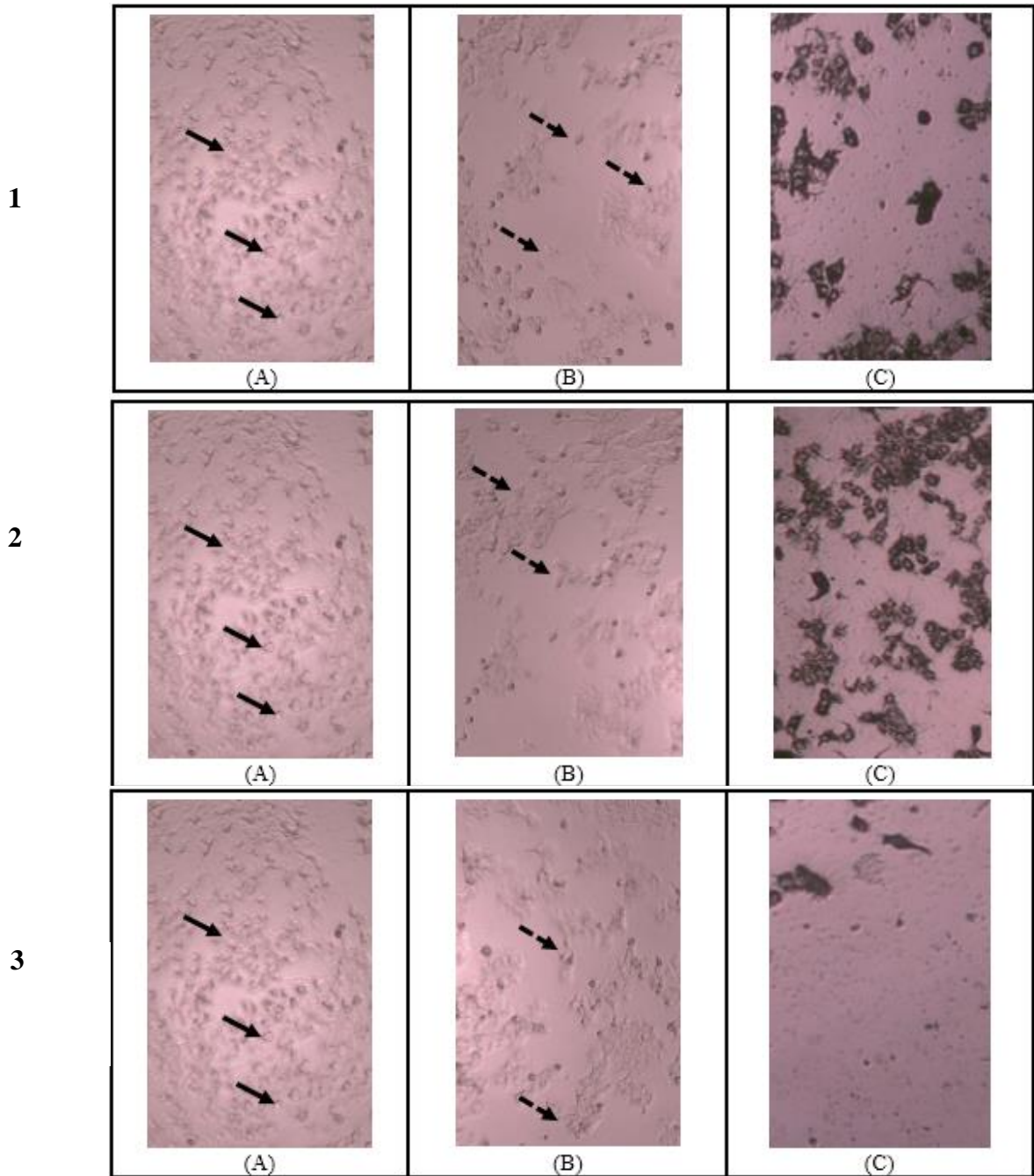
Berdasarkan hasil uji KLT diketahui bahwa ekstrak etanol daun tin mengandung senyawa metabolit sekunder flavonoid dan steroid (Gambar 1). Hal ini didasari oleh warna bercak yang berubah menjadi kecoklatan setelah diberi uap amonia juga dengan adanya bercak berwarna kuning kehijauan yang muncul pada pengamatan di bawah sinar tampak dan UV 254 nm, dan menunjukkan warna ungu pada pengamatan di bawah sinar UV 366 nm. Flavonoid merupakan salah satu dari senyawa fenol bersifat asam yang bila direaksikan dengan uap amonia yang berbentuk basa akan terbentuk warna yang disebabkan oleh terjadinya konjugasi dari senyawa aromatik (Markham, 1988).

**Tabel 1.** Aktivitas sitotoksik

Sampel	Persamaan Regresi Linier	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Keterangan
Ekstrak etanol	$y = -0,02x + 60,654$ $R^2 = 0,9062$	532,7	Sitotoksik lemah
Fraksi etil asetat	$y = -0,0662x + 62,971$ $R^2 = 0,9835$	271,46	Cukup toksik
Fraksi N-Heksan	$y = -0,0414x + 73$ $R^2 = 0,9054$	555,46	Sitotoksik lemah

Pengujian MTT secara *in vitro* dengan sel kanker MCF-7 diperoleh hasil IC<sub>50</sub> dari ekstrak etanol, fraksi etil asetat, dan fraksi n-heksan daun tin secara berturut-turut adalah 532,7; 271,46; 555,56 µg/mL (Tabel 1). Weerapreeyakul *et al.* (2012), menyatakan bahwa terdapat empat rentang kategori sitotoksitas yaitu sangat toksik jika memiliki nilai IC<sub>50</sub> <10 µg/mL, kategori toksis jika nilai IC<sub>50</sub> 10-100 µg/mL, kategori cukup toksik jika nilai IC<sub>50</sub> 101-500 µg/mL dan termasuk kategori tidak toksik apabila memiliki nilai IC<sub>50</sub> >500 µg/mL. Pada penelitian ini, ekstrak etanol dan fraksi n-heksan daun tin tidak memiliki efek sitotoksik karena memiliki nilai IC<sub>50</sub> >500 µg/mL sedangkan fraksi etil asetat cukup toksik karena memiliki nilai IC<sub>50</sub> pada rentang 101-500 µg/mL. Berdasarkan hasil tersebut menunjukkan bahwa fraksi etil asetat daun tin merupakan fraksi yang memiliki efek sitotoksik paling tinggi dibandingkan dengan ekstrak dan fraksi yang lain. Hasil ini juga sesuai dengan penelitian yang dilakukan Zubair *et al.* (2015), bahwa ekstrak etil asetat buah tin mempunyai aktivitas antiproliferatif yang kuat pada sel MCF-7 dengan nilai IC<sub>50</sub> 9,8 µg/mL dibandingkan dengan ekstrak n-heksan dan metanol. Aktivitas sitotoksik ini diduga karena tin mengandung senyawa steroid (6-*O*-acyl-*b*-D-glucosyl-*b*-sitosterols) yang merupakan hasil isolasi dari tanaman tin dan mempunyai aktivitas sitotoksik (Rubnov *et al.*, 2001). Penelitian lain juga mendukung bahwa senyawa flavonoid seperti kuersetin dan luteoilin terkandung di dalam ekstrak etanol daun tin (Vaya & Mahmood, 2006).

Selain nilai  $IC_{50}$ , pengamatan morfologi sel kanker sebelum dan sesudah perlakuan juga dilakukan dibawah mikroskop *inverted*. Perubahan morfologi sel dapat dilihat berdasarkan perubahan bentuk dari bulat menjadi tak beraturan setelah diberikan perlakuan.



**Gambar 2.** Morfologi sel MCF-7

Keterangan: 1) ekstrak etanol, 2) fraksi n-heksan, 3) fraksi etil asetat, (A) sebelum perlakuan, (B) sesudah perlakuan, (C) sesudah inkubasi dan penambahan reagen MTT

Adanya senyawa fenolik dan flavonoid dari daun tin yang mempunyai aktivitas antioksidan juga dapat berperan sebagai antikanker. Terdapat korelasi positif antara kandungan fenolik dan flavonoid total daun dan buah tin dengan  $IC_{50}$  dari aktivitas antioksidan (Wahyuni, 2014). Sifat antioksidan dalam senyawa fenolik juga dapat berperan sebagai antikanker. Pertumbuhan sel kanker dapat dihambat dengan adanya antioksidan karena memiliki kesamaan mekanisme hambatan di tingkat seluler. Senyawa antioksidan mampu menghambat oksidasi suatu molekul yang menghasilkan radikal bebas tertentu. Antioksidan akan mendonasikan atom hidrogen ke senyawa radikal sehingga menjadi bentuk tereduksi yang bersifat non radikal. Hal ini akan dapat mencegah terjadinya mutasi sel yang merupakan awal timbulnya kanker. Kerja kandungan flavonoid yang memiliki sifat sebagai antikanker meliputi inaktivasi karsinogenesis, inhibisi siklus sel, hambatan angiogenesis, proliferasi sel dan mekanisme apoptosis (Burhan *et al.*, 2019).

#### 4. Kesimpulan

Ekstrak daun tin mempunyai kandungan senyawa metabolit sekunder flavonoid dan steroid. Fraksi etil asetat daun tin (*Ficus carica* L.) memiliki aktivitas sitotoksik pada sel kanker payudara MCF-7 yang cukup toksik dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 271,46  $\mu\text{g/mL}$  sedangkan ekstrak etanol dan fraksi n-heksan memiliki aktivitas lemah. Fraksi etil asetat daun tin mempunyai potensi untuk diteliti lebih lanjut terkait elusidasi senyawa aktif dan mekanisme sitotoksiknya pada sel MCF-7.

#### Ucapan terimakasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada laboratorium sel kultur UMY yang telah menyediakan koleksi sel dan dukungannya sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik. Penelitian ini didanai oleh Hibah Kemitraan LP3M UMY 2019 dari Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

#### Daftar pustaka

- Anisa, K., Rahayu, T., & Hayati, A. (2018). Profil Metabolit Skunder Daun Tin (*Ficus carica*) melalui Analisis Histokimia dan Deteksi Flavonoid dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). *Jurnal Sains Alami (Known Nature)*, 1(1), 104-110. doi:<https://doi.org/10.33474/j.sa.v1i1.1266>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global Cancer Statistics 2018 : Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424. doi:<https://doi.org/10.3322/caac.21492>

- Burhan, A., Aisyah, A. N., Awaludin, A., Zulham, Z., Tabe, B., & FGafur, A. (2019). Efek Antioksidan dan Antikanker Ekstrak Batang Murbei (*Morus alba*. L.) terhadap Sel Kanker Widr secara in vitro. *Kartika Jurnal Ilmiah Farmasi*, 7(1), 17. doi:<https://doi.org/10.26874/kjif.v7i1.173>
- Febriansah, R., Dyaningtyas, D. P. P., Nurulita, N. A., Meiyanto, E., & Nugroho, A. E. (2014). Hesperidin as A Preventive Resistance Agent in MCF-7 Breast Cancer Cells Line Resistance to Doxorubicin. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(3), 228-233. doi:[https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(14\)60236-7](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(14)60236-7)
- Gibbs, J. B. (2000). Mechanism-based Target Identification and Drug Discovery in Cancer Research. *Science*, 287(5460), 1969-1973. doi:<https://doi.org/10.1126/science.287.5460.1969>
- Joseph, B., & Raj, S. J. (2010). Phytopharmacological Properties of *Ficus Racemosa* Linn-An Overview. *International Journal of PharmTech Research*, 3(1), 8-12.
- Markham, K. R. (1988). *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Nakano, T., Ohno, T., Ishikawa, H., Suzuki, Y., & Takahashi, T. (2010). Current Advancement in Radiation Therapy for Uterine Cervical Cancer. *Journal of Radiation Research*, 51(1), 1-8. doi:<https://doi.org/10.1269/jrr.09132>
- Phang, C.-W., Malek, S. N. A., Ibrahim, H., & medicine., a. (2013). Antioxidant Potential, Cytotoxic Activity and Total Phenolic Content of *Alpinia Pahangensis* Rhizomes. *BMC complementary*, 13(243), 1-9. doi:<https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-243>
- Refli, R. J. S. B. I. P. B. (2012). Potensi ekstrak daun tin (*Ficus carica* L) sebagai antioksidan dan aktivitas hambatannya terhadap proliferasi sel kanker HeLa.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., & Benink, H. A. (2013). Cell Viability Assay. In: Assay Guidance Manual, Sittampalam, G.S., N.P. Coussens and K. Brimacombe (Eds.). *Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences*, 357-363.
- Rubnov, S., Kashman, Y., Rabinowitz, R., Schlesinger, M., & Mechoulam, R. (2001). Suppressors of Cancer Cell Proliferation from Fig (*Ficus c Arica*) Resin: Isolation and Structure Elucidation. *Journal of Natural Products*, 64(7), 993-996. doi:<https://doi.org/10.1021/np000592z>
- Soni, N., Mehta, S., Satpathy, G., & Gupta, R. K. (2014). Estimation of Nutritional, Phytochemical, Antioxidant and Antibacterial Activity of Dried Fig (*Ficus Carica*). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3(2), 158-165.
- Tusanti, I., Johan, A., & Kisdjamiatun, R. (2014). Sitotoksisitas in Vitro Ekstrak Etanolik Buah Parijoto (*Medinilla Speciosa*, Reinw.ex Bl.) Terhadap Sel Kanker Payudara T47D. *Jurnal Gizi Indonesia*, 2(2), 53-58. doi: <https://doi.org/10.14710/jgi.2.2.53-58>
- Vaya, J., & Mahmood, S. (2006). Flavonoid Content in Leaf Extract of The Fig (*Ficus Carica* L), Carob (*Ceratonia Siliqua* L.) and Pistachio (*Pistacia Lentiscus* L.). *Biofactors*, 28(3-4), 169-175. doi:<https://doi.org/10.1002/biof.5520280303>
- Wahyuni, W. (2014). *Uji Aktivitas Antioksidan dan Sitotoksik Fraksi Etanol dari Ekstrak Etanolik Daun Waru (Hibiscus tiliaceus L.) pada Sel Kanker Serviks HeLa*. Skripsi, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta: Yogyakarta.
- Weerapreeyakul, N., Nonpunya, A., Barusrux, S., Thitimetharoch, T., & Sripanidkulchai, B. (2012). Evaluation of The Anticancer Potential of Six Herbs Against A Hepatoma Cell Line. *Chinese Medicine*, 7(15), 1-7. doi:<https://doi.org/10.1186/1749-8546-7-15>
- Zubair, R., Abu Bakar, N. H., Swethadri, G., Baig, A., Aliyu, I., & Maryam, I. U. (2015). Non-toxic Antiproliferative Effect of *Ficus Carica* Fruit Extracts on Estrogen Receptor Positive Breast Cancer Cell (MCF-7). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(10), 815-821.