

POTENSI KENTANG HITAM DALAM MEREDUKSI STRES OKSIDATIF DAN MENGHAMBAT PROLIFERASI SEL KANKER PAYUDARA MCF-7

[Potential of Black Potato in Reducing Oxidative Stress and Inhibiting the Proliferation of Breast Cancer Cells MCF-7]

Mutiara Nugraheni^{1)*}, Umar Santoso²⁾, Suparmo²⁾ dan Hastari Wuryastuti³⁾

¹⁾ Fakultas Teknik, Universitas Negeri Yogyakarta, Yogyakarta

²⁾ Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

³⁾ Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Diterima 24 September 2012 / Disetujui 23 Juli 2013

ABSTRACT

The ethanolic extracts of flesh and peel of *Coleus tuberosus* were evaluated for its ability to reduce oxidative stress using cellular antioxidant activity testing on MCF-7 cells based on oxidation of 2,7-dichlorofluoresce diacetate (DCFH). Meanwhile, the antiproliferative activities was evaluated based on 3-(4,5-Dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay in MCF-7 cells. The results showed that the ethanolic extract of flesh and peel have the ability to reduce oxidative stress and inhibit the proliferation of breast cancer cells MCF-7. The optimum concentration of ethanol extracts of peel in reducing oxidative stress was 200 µg/mL, while that of flesh was 400 µg/mL. Inhibitory concentration (IC₅₀) of cell proliferation of MCF-7 by peel extract was 698.23±1.61 (µg/mL), and flesh extracts was 829.86±5.73 (µg/mL). The ability to reduce and inhibit the proliferation showed a dose dependent manner. There is a high correlation between cellular antioxidant and antiproliferation. The correlation of cellular antioxidant activity of the ethanolic extract of flesh *Coleus tuberosus* and antiproliferation was 0.93, while the correlation between cellular antioxidant activity of the ethanolic extract of the peel and anti-proliferation was 0.98. These results suggest that the ethanolic extract of flesh and peel of *Coleus tuberosus* can be used as a source of natural antioxidants and anti-proliferation.

Keywords: anti-proliferation, black potato (*Coleus tuberosus*), cellular antioxidant, MCF-7 cells

ABSTRAK

Ekstrak etanol daging dan kulit kentang hitam dievaluasi kemampuannya dalam mereduksi stress oksidatif dengan aktivitas antioksidan seluler pada sel MCF-7 berdasarkan oksidasi 2,7-diasetat diklorofluorescein (DCFH). Sedangkan aktivitas antiproliferasi dievaluasi menggunakan 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-dipheniltetrazolium bromida (MTT) pada sel MCF-7. Hasil menunjukkan bahwa ekstrak etanol daging dan kulit memiliki kemampuan mereduksi stress oksidatif dan menghambat proliferasi sel kanker payudara MCF-7. Konsentrasi optimum ekstrak etanol kulit kentang hitam dalam mereduksi stress oksidatif adalah 200 µg/mL, sedangkan ekstrak daging adalah 400 µg/mL. *Inhibitory Concentration* (IC₅₀) penghambatan 50% proliferasi sel MCF-7 oleh ekstrak kulit adalah 698.23±1.61 (µg/mL) dan ekstrak daging adalah 829.86±5.73 (µg/mL). Kemampuan mereduksi dan menghambat proliferasi tergantung pada konsentrasi yang digunakan. Terdapat korelasi yang tinggi antara antioksidan seluler dan antiproliferasi. Korelasi aktivitas antioksidan seluler ekstrak etanol daging kentang hitam dan antiproliferasi adalah 0.93, sedangkan korelasi aktivitas antioksidan seluler ekstrak etanol kulit kentang hitam dan antiproliferasi adalah 0.98. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daging dan kulit kentang hitam dapat digunakan sebagai sumber antioksidan dan anti proliferasi alami.

Kata kunci: anti-proliferasi, antioksidan seluler, kentang hitam, sel-sel MCF-7

PENDAHULUAN

Tubuh manusia setiap hari selalu berinteraksi dengan spesies oksigen reaktif (SOR) yang berasal dari sinar UV, asap rokok, polusi udara, radiasi, obat (asetaminofen, bleomisin), metabolisme normal tubuh, dan inflamasi yang dapat bereaksi dan menyebabkan terjadinya kerusakan dan mutasi pada sel, mengoksidasi karbohidrat, lipida, protein dan DNA (Borek, 2004). Termasuk dalam SOR adalah radikal anion superoksida (O₂⁻), oksigen singlet (¹O₂), hidrogen peroksida (H₂O₂) dan radikal hidroksil ([•]OH) (Lopez-Lazaro, 2007).

Meskipun dalam tubuh terdapat sistem pertahanan antioksidan yaitu antioksidan enzim (superoksida dismutase, katalase, glutathion peroksidase), vitamin E, yang mempunyai struktur molekul yang dapat mendonorkan elektronnya kepada molekul SOR tanpa mengganggu stabilitas molekulnya dan dapat memutus reaksi berantai dari radikal bebas, tetapi tubuh dapat mengalami stress oksidatif akibat ketidakseimbangan antara produksi atau konsentrasi SOR dan kemampuan antioksidan dalam sel yang dapat mengarah pada kerusakan oksidatif (Manda *et al.* 2009; Waris dan Ahsan, 2006). Spesies oksigen reaktif dapat ditangkap oleh sistem pertahanan antioksidan dalam tubuh dan senyawa fitokimia, seperti fenolik, karotenoid, vitamin yang terdapat dalam buah-buahan dan sayuran.

*Penulis Korespondensi:
Email: mutiara_nugraheni@yahoo.com

Kentang hitam (*Coleus tuberosus*) termasuk jenis sayuran berbentuk umbi, termasuk dalam bangsa yang sama dengan kentang (*Solanum tuberosum*) yaitu *Solanales* dan digolongkan dalam Famili *Lamiceae* dan sub Famili *Nepetoideae*. Berdasarkan penggunaan *ethnobotanical* dan filogeni pada *Plecthrantus*, maka kentang hitam termasuk dalam kelompok tanaman yang tidak hanya digunakan sebagai makanan namun juga digunakan dalam pengobatan. Kentang hitam merupakan tanaman pangan yang potensial sebagai sumber pangan alternatif, namun pembudidayaan di masyarakat makin langka. Pemilihan kentang hitam sebagai objek penelitian ini adalah selaras pencaanangan bidang strategis nasional oleh Presiden RI pada tahun 2008. Salah satu bidang strategis nasional yang memerlukan penelitian intensif yaitu diversifikasi konsumsi pangan berbasis sumber daya lokal dengan eksplorasi pemanfaatan tanaman pangan non konvensional, termasuk diantaranya umbi-umbian.

Penelitian Hsum *et al.* (2008) menunjukkan bahwa ekstrak umbi kentang hitam (*Coleus tuberosus*) yang menggunakan pelarut kloroform memiliki senyawa potensial sebagai antitumor pada sel Raji. Mooi *et al.* (2010) membuktikan bahwa ekstrak kentang hitam mengandung fitosterol dan asam triterpenoat (asam maslinat) dan mampu menghambat ekspresi EBV early-antigen pada sel Raji. Hsum *et al.* (2011) membuktikan bahwa asam maslinat memiliki kemampuan untuk menekan ekspresi COX-2 dan menghambat Nf-kB dan aktivasi AP-1 pada sel Raji. Nugraheni *et al.* (2011) membuktikan bahwa ekstrak etanol kentang hitam mengandung senyawa asam triterpenoat yaitu asam ursolat dan asam oleanolat. Beberapa penelitian membuktikan asam ursolat dan asam oleanolat memiliki sifat fungsional sebagai anti-tumor (Yasukawa *et al.* 2009; Feng *et al.* 2009; Duval *et al.* 2008).

Kanker adalah salah satu penyakit degeneratif yang mengakibatkan tingginya angka kematian. Berdasarkan laporan *World Cancer Research Fund* (WCRF) dan *the American Institute for Cancer Research* (AICR), kasus kanker diramalkan kejadiannya terus meningkat dari 10.3 juta kasus pada tahun 1996 menjadi 14.7 juta pada tahun 2020, dimana kanker payudara adalah penyebab kedua, kematian pada wanita (Opata dan Izevbigie, 2006). Menurut WHO, 8-9% wanita menderita kanker payudara sehingga merupakan jenis kanker yang paling banyak diderita oleh wanita. Berdasar data Sistem Informasi Rumah Sakit (SIRS) 2007, kejadian kanker payudara mencapai 8.227 kasus atau 16.85% sedangkan kanker leher rahim sebanyak 5.786 kasus atau 1178%. Hal ini membuktikan bahwa kanker payudara masih menduduki peringkat pertama di Indonesia (Yusharmen, 2010).

Salah satu sel kanker payudara yang digunakan dalam penelitian tentang kanker payudara adalah *Michigan Cancer Foundation-7* (MCF-7). *Michigan Cancer Foundation-7* adalah sel kanker payudara yang memiliki reseptor positif estrogen, dalam hal ini estrogen tersebut dapat menstimulasi proliferasi (perbanyak) sel yang telah mengalami mutasi. Ciri khas sel kanker adalah mengalami proliferasi yang cepat. Proliferasi pada sel kanker adalah pertumbuhan tidak terkendali dan pembelahan tanpa batas. Saat ini yang menjadi masalah paling penting pada kesehatan masyarakat dalam mencegah kanker adalah mengembangkan metode yang efektif untuk meng-

hentikan rangkaian karsinogenesis dengan kemopreventif berbasis pada senyawa bioaktif dari tanaman yang dapat menghambat terjadinya proliferasi. Salah satunya adalah dengan mengonsumsi senyawa-senyawa fitokimia yang terdapat dalam makanan yang memiliki kemampuan sebagai antioksidan seluler. Hal ini dikarenakan senyawa fitokimia tersebut memiliki potensi untuk berinteraksi dengan proses kanker pada tingkat genetik, memodifikasi sisi detoksifikasi obat, perbaikan DNA, dan proliferasi sel. Intervensi diet yang mengandung senyawa fitokimia yang memiliki kemampuan sebagai antioksidan seluler dapat menjadi strategi kunci untuk mencegah perkembangan kanker.

Penelitian ini bertujuan untuk (1) mengetahui kemampuan ekstrak etanol daging dan kulit kentang hitam dalam mereduksi stres oksidatif pada sel kanker payudara MCF-7 yang dalam hal ini dievaluasi dengan aktivitas antioksidan seluler. (2) mengetahui kemampuan ekstrak etanol daging dan kulit kentang hitam dalam menghambat proliferasi sel kanker MCF-7. (3) mengetahui korelasi antara aktivitas antioksidan seluler dengan kemampuan menghambat proliferasi sel kanker payudara MCF-7. Penggunaan sel kanker MCF-7 diharapkan lebih dapat menggambarkan kompleksitas sistem biologi dan merupakan alat yang penting untuk memeriksa makanan, fitokimia dan suplemen makanan yang potensial untuk aktivitas biologi, karena model aktivitas antioksidan seluler ini mempertimbangkan pengambilan senyawa oleh sel, distribusi dan efisiensi perlindungan terhadap radikal bebas dibawah kondisi fisiologis tubuh.

BAHAN DAN METODE

Bahan untuk penentuan aktivitas antioksidan seluler dan anti-proliferasi pada sel MCF-7

Bahan yang diuji ada dua yaitu ekstrak etanol kulit dan daging kentang hitam mentah, dan Sel MCF-7 (ATCC, *American Type Culture Collection*). Bahan kimia: 2',7'-dichlorfluorescein-diacetate (DCFH-DA) (Sigma Aldrich), *Phorbol myristate acetate* (PMA) (Sigma Aldrich), *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) (Sigma Aldrich), *Fetal Bovine Serum* (Gibco). *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) (Sigma Aldrich), 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) (Sigma Aldrich), DMSO (Sigma Aldrich), *Phosphate buffered saline* (PBS) (Gibco).

Persiapan ekstrak etanol daging dan kulit kentang hitam

Kentang hitam mentah dipisahkan kulit dan daging umbinya. Ketebalan pengupasan kulit (1-1.5 mm) dan daging umbi dikeringkan menggunakan *cabinet drier* pada suhu 40°C selama 24 jam. Kemudian dilakukan pengecilan ukuran dan diayak dengan ayakan *tyler* ukuran 80 mesh. Bahan baku kemudian disimpan dalam *freezer* (-20°C). Tepung kulit dan daging umbi kentang hitam mentah dimaserasi dengan etanol selama 7 hari (1:5), kemudian disaring menggunakan kertas *whatman* No.1, dikeringkan dengan *vacuum rotary evaporator* suhu 45°C dan disimpan pada suhu -20°C (Mooi *et al.* 1999).

Evaluasi aktivitas antioksidan seluler ekstrak daging dan kulit kentang hitam mentah pada sel MCF-7

Penentuan aktivitas antioksidan seluler mengacu pada Wolfe dan Liu (2007); Liu dan Finley (2005). Penumbuhan *cell lines* dari penyimpanan nitrogen cair untuk uji aktivitas antioksidan adalah sel beku dari nitrogen cair dibiarkan pada suhu kamar sampai mencair sebagian, kemudian dimasukkan dalam tabung konikal 15 mL, dan ditambah 10 mL media pencuci lalu dikocok. Setelah itu disentrifus 750 g selama 7 menit. Pelet diambil ditambahkan dengan media kultur, kemudian sel dimasukkan dalam *flask*. Sel MCF-7 dikulturkan menggunakan media kultur DMEM. Semua kegiatan dilakukan secara aseptis dalam laminar *airflow*. Sel kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dengan aliran CO₂ 5%. Perkembangan sel diamati tiap hari dan jika media mulai menguning diganti dengan media baru.

Jika sel sudah tumbuh memenuhi *flask*, media pada sel MCF-7 diambil, dicuci dengan PBS secukupnya. Selanjutnya sel dilepas dari dinding *flask* (*scapper*) menggunakan 0.5 mL tripsin 0.05%. *Flask* dikocok perlahan-lahan sampai semua sel terlepas semua. Selanjutnya suspensi sel tersebut dimasukkan dalam tabung *conical* 15 mL dan ditambahkan dengan media kultur sebanyak 5 mL. Jumlah sel dihitung dengan *hemocytometer*, disuspensikan dalam media kultur sampai diperoleh kepadatan sel 1.5×10^4 sebanyak 100 μ L pada setiap sumuran. Sel MCF-7 ditumbuhkan pada *microplate* yang terdiri dari 96 sumuran dengan medium DMEM yang ditambah 10% (v/v) *fetal bovine serum*, 100 U *Penicilin* dan 100 mg/mL *Streptomycin* pada kondisi 37°C, 5% CO₂. Dua puluh empat jam setelah ditumbuhkan pada *microplate*, medium pertumbuhan dibuang dan sumuran dicuci dengan PBS. Senyawa yang digunakan adalah ekstrak etanol kulit dan daging kentang hitam, dengan konsentrasi 100, 200, 400 dan 800 μ g/mL DMSO. Tiga sumuran diperlakukan selama 20 menit dengan 100 mikromol ekstrak etanol kulit dan daging kentang hitam mentah (100, 200, 400 dan 800 μ g/mL). Kemudian ditambah 25 μ M DCFH-DA dilarutkan dalam medium perlakuan dan PMA (100 ng/mL DMSO) selama 30 menit. Sejumlah 10.000 sel MCF-7 ditera fluoresensinya menggunakan *flow cytometer* BD FACS Calibur pada panjang gelombang 535 nm. Aktivitas antioksidan seluler ditentukan dengan menghitung persentase penurunan ROS yang dimonitoring dengan intensitas fluoresensi:

$$\text{Persentase penurunan ROS} = (\text{Fit}_0 - \text{Fit}_1) \times 100 / (\text{Fit}_0 - \text{Fit}_2)$$

Fit₀: kontrol dengan stress oksidatif; Fit₁: sel yang diperlakukan dengan ekstrak; Fit₂: kontrol tanpa stress oksidatif (Muanda *et al.* 2011).

Evaluasi anti-proliferasi menggunakan sel kanker MCF-7

Metode mengacu pada Hogan *et al.* (2010). Sel kanker payudara MCF-7 (1.5×10^4 sel/mL) ditumbuhkan pada *microplate* yang terdiri dari 96 sumuran dengan medium DMEM yang ditambah 10% (v/v) FBS, 100 U *Penicilin* dan 100 mg/mL *Streptomycin* pada kondisi 37°C, 5% CO₂. Sel segera diinkubasi dengan ekstrak etanol kulit (700-1000 μ g/mL) dan daging kentang hitam mentah (700-1000 μ g/mL) selama 72 jam pada kondisi 5% CO₂, 37°C pada inkubator. Medium per-

tumbuhan yaitu DMEM dihilangkan setelah 72 jam inkubasi, dicuci dengan HBSS dan kemudian sel diinkubasi selama 4 jam dengan 200 μ L larutan reagen MTT (0.5 mg/mL dalam DMEM) ditambahkan pada tiap-tiap sumuran. Kemudian ditambah *dimethyl sulfoxida* (200 μ L), didiamkan selama semalam.

Absorbansi dimonitor pada 550 nm dengan *Elisa reader*. Data absorbansi dibutuhkan untuk viabilitas seluler yang diekspresikan sebagai persentase perlakuan ekstrak etanol kulit dan daging kentang hitam mentah terhadap kontrol. Viabilitas sel akibat perlakuan ditentukan dengan:

$$\text{Viabilitas sel (\%)} = (\text{Abs perlakuan} / \text{Abs tanpa perlakuan}) \times 100$$

Kapasitas ekstrak etanol kulit dan daging kentang hitam mentah diekspresikan dalam IC₅₀ (*Inhibitory Concentration* 50) yaitu konsentrasi yang diperlukan untuk menghambat viabilitas sel sebesar 50%. Kurva persentase viabilitas sel kemudian diplot kembali antara konsentrasi ekstrak dan viabilitas. Konsentrasi penghambatan diperlukan untuk menurunkan 50% viabilitas sel (IC₅₀) dibandingkan dengan kontrol yang tidak diperlakukan. Makin rendah IC₅₀, maka makin tinggi kapasitas atau kemampuan senyawa sebagai anti-proliferasi.

Analisis statistik

Percobaan dilakukan dengan tiga ulangan. Data yang ditampilkan adalah rata-rata \pm SD dari tiga ulangan. Pengujian antioksidan aktivitas antioksidan seluler dilakukan dengan anova satu jalur, apabila terdapat beda nyata kemudian dilanjutkan dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT). Pengujian antiproliferasi dilakukan dengan rancangan faktorial (4 perlakuan x 3 ulangan). Korelasi antara metode pengujian dilakukan dengan *spearman correlation*, menggunakan SPSS versi 16.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

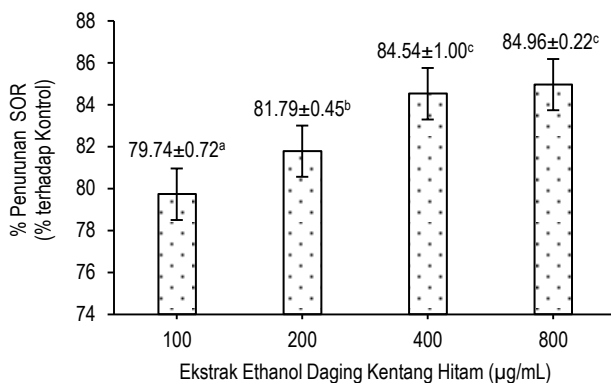
Aktivitas antioksidan seluler

Kemampuan mereduksi stres oksidatif dilakukan dengan pengujian aktivitas antioksidan seluler (*cellular antioxidant activity/CAA*) pada kultur sel (Wolfe dan Liu, 2007; Wolfe dan Liu, 2008). Sel diinkubasi dengan senyawa antioksidan dan pewarna sel yaitu DCFH-DA (*2',7'-dichlorofluorescein diacetate*). Antioksidan berikatan dengan membran sel dan atau melewati membran untuk masuk ke dalam sel. DCFH-DA berdifusi ke dalam sel dimana esterase seluler melepaskan diasetat sehingga membentuk DCFH yang lebih polar. Sel yang diperlakukan dengan peroksid radikal yang dapat berdifusi ke dalam sel, misalnya *2,2'-Azo-bis-amidinopropane* (ABAB), H₂O₂, *phorbol miristate acetate* (PMA) secara spontan akan terdekomposisi menjadi bentuk peroksid radikal. Peroksid radikal ini menyerang membran sel dan menghasilkan lebih banyak radikal dan mengoksidasi DCFH intraseluler ke bentuk fluoresen DCF. Adanya antioksidan mencegah oksidasi DCFH, membran lipida dan menurunkan pembentukan DCF (Wolfe dan Liu, 2007). Fluoresen DCF ini diukur dengan *flow cytometer*. Tingkat fluoresen diukur dan proporsional dengan tingkat oksidasi. Senyawa fitokimia murni dan ekstrak buah, sayuran dan

tanaman dapat menangkap peroksid radikal dan menghambat pembentukan DCF. Aktivitas antioksidan seluler menggunakan kemampuan peroksid radikal, produk reaktif dari oksidasi lipida, untuk memicu pembentukan fluoresen oksidatif stress sebagai indikator dalam kultur sel dan mengukur pencegahan oksidasi oleh antioksidan. Perubahan DCFH-DA menjadi bentuk fluoresen (DCF) sehingga dapat ditera dengan *flow cytometer*.

Persentase penurunan SOR pada sel MCF-7 yang diinkubasi dengan ekstrak etanol daging kentang hitam pada konsentrasi 100, 200, 400 dan 800 $\mu\text{g/mL}$ kemudian diinduksi PMA diperlihatkan pada Gambar 1.

Ekstrak etanol daging kentang hitam mampu menurunkan terbentuknya SOR pada sel MCF-7 yang diinduksi PMA tergantung pada konsentrasi ekstrak yang digunakan. Persentase penurunan terbentuknya SOR ekstrak etanol daging kentang hitam pada konsentrasi 400 $\mu\text{g/mL}$ tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 800 $\mu\text{g/mL}$, sehingga penggunaan ekstrak etanol daging kentang hitam optimum pada konsentrasi 400 $\mu\text{g/mL}$ (Gambar 1).



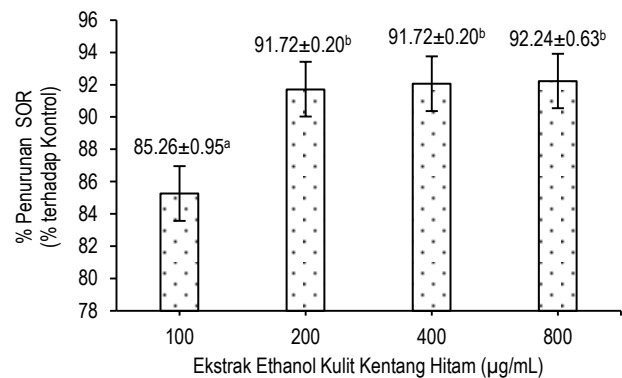
Keterangan: Notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata ($p < 0.05$)

Gambar 1. Persentase penurunan spesies oksigen reaktif (SOR) dengan perlakuan ekstrak etanol daging kentang hitam pada sel MCF-7 yang diinduksi dengan *Phorbol Myristate Asetat* (PMA)

Persentase penurunan SOR pada MCF-7 yang diinkubasi dengan ekstrak etanol kulit kentang hitam konsentrasi 100, 200, 400 dan 800 $\mu\text{g/mL}$ dan diinduksi PMA (Gambar 2). Ekstrak etanol kulit kentang hitam mentah mampu menurunkan SOR pada sel MCF-7 yang diinduksi PMA tergantung pada konsentrasi ekstrak yang digunakan. Persentase penurunan terbentuknya SOR ekstrak etanol kulit kentang hitam pada konsentrasi 200 $\mu\text{g/mL}$ tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 400 dan 800 $\mu\text{g/mL}$, sehingga penggunaan ekstrak etanol kulit kentang hitam optimum adalah pada konsentrasi 200 $\mu\text{g/mL}$ (Gambar 2).

Penelitian ini membuktikan bahwa ekstrak etanol kulit kentang hitam mentah dan ekstrak etanol daging kentang hitam mentah mampu menurunkan SOR pada sel MCF-7 yang diinduksi PMA. Kemampuan menurunkan ROS diduga berkaitan dengan kandungan senyawa bioaktif dalam kentang hitam, seperti asam ursolat dan asam oleanolat yang dapat bertindak sebagai penangkap spesies oksigen reaktif. Nugraheni *et al.* (2011) membuktikan bahwa kentang hitam mengandung senyawa asam ursolat dan asam oleanolat. Hasil penelitian ini

sesuai dengan hasil penelitian Dekanski *et al.* (2009) yang membuktikan bahwa perlakuan ekstrak daun *Olive* yang mengandung asam triterpenoat yaitu asam oleanolat dan asam maslinat dapat bertindak sebagai penangkap radikal bebas dan meningkatkan kadar antioksidan enzim SOD dan katalase dibandingkan dengan kontrol.



Keterangan: Notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata ($p < 0.05$)

Gambar 2. Persentase penurunan spesies oksigen reaktif (SOR) dengan perlakuan ekstrak etanol kulit kentang hitam pada sel MCF-7 yang diinduksi dengan *Phorbol Myristate Asetat* (PMA)

Selain asam ursolat dan asam oleanolat, ekstrak etanol kentang hitam memiliki beberapa jenis senyawa bioaktif diantaranya asam maslinat, dan fitosterol, seperti stigmasterol, beta-sitosterol dan kampesterol (Mooi *et al.* 2010) dan senyawa fenol. Asam maslinat dan fitosterol dapat meningkatkan aktivitas antioksidan seluler baik enzimatis maupun non enzimatis (Dekanski *et al.* 2009; Vivancos dan Moreno, 2008). Senyawa fenol memiliki kemampuan meningkatkan sistem pertahanan antioksidan (Giovannini *et al.* 2008; Verma *et al.* 2009; O'Sullivan *et al.* 2011), sehingga mampu mencegah oksidasi DCFH dan menurunkan pembentukan DCF fluoresen (Salawu *et al.* 2011; Muanda *et al.* 2011).

Mekanisme pengurangan SOR pada ekstrak etanol daging kentang hitam mentah dan ekstrak etanol kulit kentang hitam mentah diduga seperti mekanisme senyawa bioaktif yang terkandung didalamnya (asam ursolat, asam oleanolat, asam maslinat dan fitosterol) yaitu menangkap SOR yang menyerang membran sel. Peningkatan SOR pada sel menyebabkan lipida pada membran sel mengalami oksidasi sehingga membran sel mengalami perubahan permeabilitas dan fluiditas (Prades *et al.* 2011). Asam ursolat, asam oleanolat, asam maslinat, fitosterol memiliki kemampuan menjaga fluiditas membran sel dengan menangkap SOR, sehingga sinyal komunikasi tingkat seluler dapat berjalan dengan baik termasuk diantaranya sinyal yang berkaitan dengan aktivasi antioksidan enzim (Nrf-2-ARE) (Zhao *et al.* 2010).

Peningkatan ekspresi Nrf-2-ARE dengan meningkatkan sistem pertahanan antioksidan dalam sel (SOD, CAT, GPx, Glutathione, vitamin E dan karoten). Peningkatan sistem pertahanan antioksidan sel (SOD, CAT, GPx) memberikan pengaruh pada meningkatnya kemampuan menetralkan radikal anion superoksida ($\text{O}_2^{\cdot-}$), oksigen singlet ($^1\text{O}_2$), hidrogen

peroksida (H_2O_2) dan radikal hidroksil ($\cdot OH$) akibat induksi PMA. Peningkatan glutathione, vitamin E dan karoten dalam sel dapat meningkatkan penangkapan radikal bebas yang terdapat dalam sel, sehingga dapat menurunkan jumlah radikal bebas dalam sel MCF-7.

Penelitian ini membuktikan bahwa ekstrak etanol kulit kentang hitam mentah mampu menurunkan SOR lebih besar dibandingkan ekstrak etanol daging kentang hitam mentah. Perbedaan kemampuan menurunkan SOR, salah satunya diduga berkaitan dengan perbedaan kandungan asam ursolat, asam oleanolat, asam maslinat, fitosterol dan senyawa fenol. Senyawa bioaktif dalam kentang hitam yaitu asam ursolat dapat menurunkan SOR lebih besar dibandingkan asam oleanolat. Hal ini sesuai dengan penelitian Ovesna *et al.* (2006) yang membuktikan bahwa asam ursolat memiliki aktivitas antioksidatif lebih tinggi dibandingkan asam oleanolat. Perbedaan kemampuan antioksidatif asam ursolat dan asam oleanolat diduga karena ada perbedaan posisi satu grup metil pada struktur kimia yang menyebabkan perbedaan kemampuan dalam meningkatkan sistem pertahanan antioksidan (SOD, CAT, GPx, GSH, vitamin E) yang mempengaruhi kemampuan dalam menetralkan dan menangkap SOR.

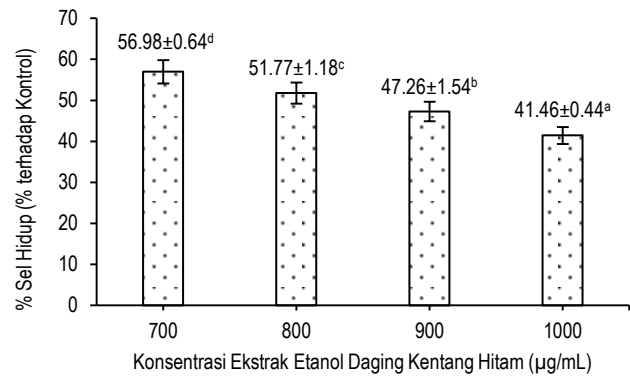
Anti-proliferasi ekstrak daging dan kulit kentang hitam

Evaluasi antiproliferasi dilakukan dengan metode MTT. Beberapa jenis metode untuk memprediksi karsinogenitas dilakukan secara *in vitro*. Prinsipnya adalah mereaksikan senyawa bioaktif dengan sel kanker yang menjadi sel uji coba. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida (MTT) assay digunakan untuk mengevaluasi aktivitas anti-proliferasi ekstrak yang diuji dengan sel kanker. Konversi garam tetrazolium (MTT) menjadi formazan biru hanya terdapat pada sel yang masih hidup dan jumlah formazan diproduksi secara proporsional pada jumlah sel hidup yang ada. Sehingga MTT assay potensial digunakan untuk menguji aktivitas anti-proliferasi dari ekstrak bahan (Althunibat *et al.* 2009).

Persentase sel MCF-7 yang hidup pada perlakuan ekstrak etanol daging kentang hitam konsentrasi 700, 800, 900 dan 1000 $\mu g/mL$ dengan waktu inkubasi 72 jam diperlihatkan pada Gambar 3.

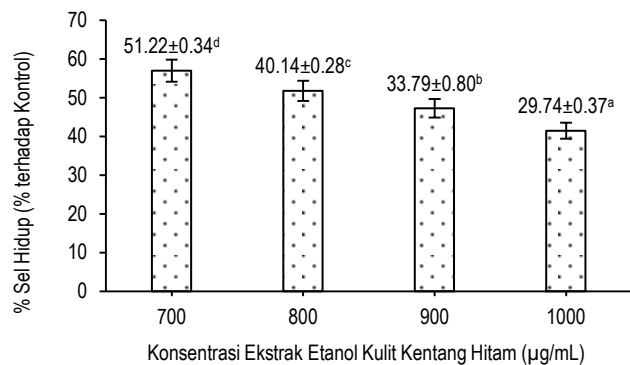
Penelitian ini menunjukkan persentase sel hidup MCF-7 dipengaruhi oleh konsentrasi ekstrak. Makin besar konsentrasi yang diberikan (700-1000 $\mu g/mL$) pada sel MCF-7, makin sedikit jumlah sel yang hidup. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daging kentang hitam memiliki potensii sebagai anti-proliferasi pada sel MCF-7, yang dibuktikan dengan makin menurunnya jumlah sel hidup pada inkubasi dengan variasi konsentrasi dibandingkan dengan kontrol (Gambar 3). Persentase sel MCF-7 yang hidup pada perlakuan ekstrak etanol kulit kentang hitam konsentrasi 700, 800, 900 dan 1000 $\mu g/mL$ dengan waktu inkubasi 72 jam disajikan pada Gambar 4.

Persentase sel hidup MCF-7 tergantung pada konsentrasi ekstrak etanol kulit kentang hitam. Makin besar konsentrasi yang diberikan (700-1000 $\mu g/mL$) pada sel MCF7, makin sedikit jumlah sel yang hidup (Gambar 4). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit kentang hitam memiliki potensi sebagai anti-proliferasi.



Keterangan: Notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata ($p < 0.05$)

Gambar 3. Pengaruh ekstrak etanol daging kentang hitam terhadap persentase sel hidup MCF-7 dengan waktu inkubasi selama 72 jam yang diukur dengan metode MTT



Keterangan: Notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata ($p < 0.05$)

Gambar 4. Pengaruh ekstrak etanol kulit kentang hitam terhadap persentase sel hidup MCF-7 dengan waktu inkubasi selama 72 jam menggunakan metode MTT

Penelitian ini membuktikan bahwa ekstrak etanol daging dan kulit kentang hitam mampu menghambat proliferasi sel MCF-7 yang bergantung pada konsentrasi yang digunakan. Hal ini diduga berkaitan dengan aktivitas anti-proliferasi sel kanker yang dimiliki oleh senyawa bioaktif didalam kentang hitam, seperti asam ursolat, asam oleanolat, asam maslinat, fitosterol dan senyawa fenol (Arshad *et al.* 2010; Nisa *et al.* 2011).

Tabel 1 menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit kentang hitam memiliki kemampuan antiproliferasi lebih besar dibandingkan dengan ekstrak etanol daging kentang hitam. Makin kecil nilai IC_{50} , maka makin sedikit konsentrasi yang diperlukan untuk menghambat proliferasi sel kanker MCF-7 selama inkubasi 72 jam. Hal ini dibuktikan, perlakuan ekstrak etanol kulit kentang hitam menyebabkan jumlah sel MCF-7 yang hidup lebih sedikit dibandingkan perlakuan dengan ekstrak etanol daging kentang hitam pada variasi konsentrasi yang digunakan (Gambar 3 dan 4). Hal ini diduga berkaitan dengan perbedaan kandungan asam triterpenoat yaitu asam ursolat dan asam oleanolat, dimana ekstrak etanol kulit kentang hitam mentah memiliki kandungan asam ursolat dan asam oleanolat yang lebih besar dibandingkan ekstrak etanol daging kentang hitam mentah. Ekstrak etanol kulit kentang mengandung asam ursolat $13.78 \pm 0.15 \mu g/g$ sampel dan asam oleanolat $19.75 \pm 0.30 \mu g/g$

sampel sedangkan ekstrak etanol daging kentang hitam mengandung asam ursolat $3.41 \pm 0.04 \mu\text{g/g}$ sampel; dan asam oleanolat $3.71 \pm 0.07 \mu\text{g/g}$ sampel. Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa asam ursolat dan asam oleanolat sebagai senyawa bioaktif mampu menghambat proliferasi sejumlah sel kanker dan senyawa bioaktif ini bertanggung jawab terhadap aktivitas anti-proliferasi pada ekstrak beberapa tanaman yang mengandung asam ursolat dan asam oleanolat (Yamaguchi *et al.* 2008).

Tabel 1. IC₅₀ perlakuan ekstrak etanol daging dan kulit pada sel MCF 7 dengan waktu inkubasi 72 jam

Senyawa	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
Ekstrak etanol daging kentang hitam	829.86 ± 5.73^a
Ekstrak etanol kulit kentang hitam	698.23 ± 1.61^b

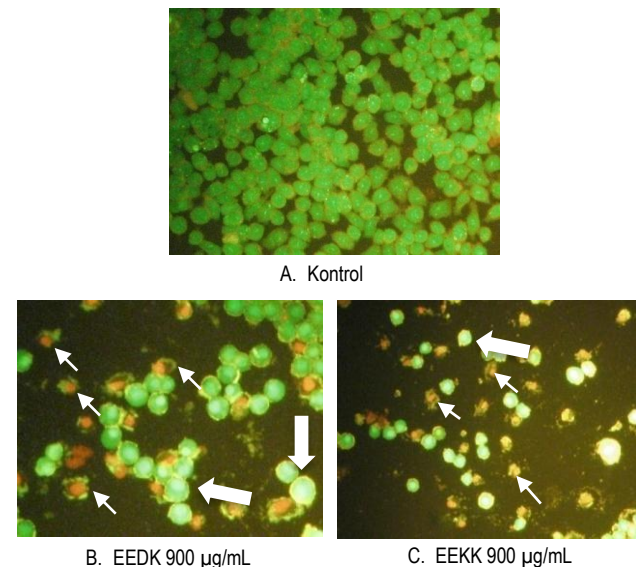
Keterangan: Angka diekspresikan sebagai rata-rata \pm SD (n=3). Angka dengan notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata ($p < 0.05$)

Keterkaitan aktivitas antioksidan seluler dalam menghambat proliferasi sel kanker payudara MCF-7

Kemampuan aktivitas antioksidan seluler kentang hitam dapat menghambat proliferasi sel kanker payudara melalui beberapa mekanisme. Mekanisme penghambatan proliferasi ekstrak etanol daging kentang hitam, ekstrak etanol kulit kentang hitam, pada sel MCF-7 diduga melalui tiga jalur, yaitu:

- (1) Aktivitas antioksidan seluler kentang hitam (Gambar 1 dan 2) dapat menurunkan spesies oksigen reaktif (SOR) yang berdampak pada penurunan stres oksidatif. Kemampuan menurunkan stres oksidatif dapat berdampak pada penurunan ekspresi *Nuclear Factor- κ B* (NF- κ B) beserta ekspresi gen yang berkaitan dengan stres oksidatif pada sel MCF-7 yaitu COX-2, AP-1, Bcl-2 dan Bcl-XL yang dapat menghambat proliferasi sel kanker payudara MCF-7 (Li *et al.* 2010; Manu dan Kuttan, 2008; Pathak *et al.* 2007; Wang *et al.* 2009; Shan *et al.* 2009).
- (2) Penurunan SOR dapat berdampak pada pengendalian siklus sel beserta ekspresi gen yang mengatur siklus sel yaitu p27, p21, p53, dan *Cyclin D1*. Penurunan SOR diduga berdampak pada penurunan NF- κ B, sebab ekspresi NF- κ B tergantung pada induksi SOR. Penurunan NF- κ B dapat memberikan efek penurunan ekspresi *Cyclin D1* dan peningkatan *tumor suppressor* seperti p27, p21 dan p53, sehingga terjadi *cell cycle arrest*, sehingga proliferasi sel kanker dapat dihambat (Chen *et al.* 2010; Shyu *et al.* 2010; Pathak *et al.* 2007; Martin *et al.* 2006; Jeong *et al.* 2009; Obinaju *et al.* 2010; Chou *et al.* 2010).
- (3) Aktivitas antioksidan seluler dapat menginduksi apoptosis sel kanker payudara MCF-7 melalui fragmentasi DNA dengan meningkatkan ekspresi *apoptosis-inducing factor* (AIF). Fragmentasi DNA dibuktikan dengan evaluasi pengecatan menggunakan *acridine orange-ethidium bromide* yang menunjukkan terjadinya induksi apoptosis (Gambar 5). Salah satu ciri apoptosis adalah terjadinya fragmentasi DNA yang dengan pengecatan AO-EB akan berwarna *orange* karena terjadi interkalasi antara EB dan DNA. Sel MCF-7 yang digunakan pada penelitian ini berasal dari ATCC, yang memiliki karakteristik tidak mengekspresikan *caspase 3* sebagai eksekutor terjadinya fragmentasi DNA pada induksi apoptosis. Berdasarkan hal tersebut,

maka induksi apoptosis oleh OA pada sel MCF-7 melalui mekanisme lain yaitu *Apoptosis inducing factor* (AIF) (Kwon *et al.* 2010; Yang *et al.* 2010).



Gambar 5. Induksi apoptosis pada sel MCF-7. (A) kontrol; (B) ekstrak etanol daging kentang hitam (EEDK) dan (C) ekstrak etanol kulit kentang hitam (EEKK). Pengamatan morfologi sel MCF-7 yang mengalami apoptosis dilakukan dengan pengecatan *acridine orange/ethidium bromide* (AO-EB) dan diamati dengan mikroskop fluoresen. Kontrol (A) sel hidup, bentuk normal dan berwarna hijau; B, dan C menunjukkan induksi apoptosis, beberapa sel telah mati, berubah bentuk, serta warna sel menjadi hijau terang sampai *orange*. Tanda panah berwarna putih besar adalah apoptosis awal (warna hijau terang), sedangkan tanda panah berwarna putih, adalah apoptosis akhir (warna *orange*). (A, B perbesaran 400x, sedangkan C perbesaran 200x)

Kemampuan antioksidan seluler kentang hitam dalam menurunkan sel hidup kanker payudara MCF-7 diduga karena interaksi dan sinergisitas antara senyawa-senyawa bioaktif yang terdapat dalam ekstrak etanol daging dan kulit kentang hitam yaitu asam ursolat, asam oleanolat, fitosterol: stigmasterol, beta-sitosterol dan campesterol serta *asam maslinat*, dan senyawa.

Korelasi antara evaluasi aktivitas antioksidan seluler ekstrak etanol daging kentang hitam dan anti-proliferasi adalah 0.93; sedangkan antara aktivitas antioksidan seluler ekstrak etanol kulit kentang hitam dan anti-proliferasi adalah 0.98. Penelitian ini membuktikan bahwa makin tinggi kemampuan ekstrak etanol daging kentang hitam dan ekstrak etanol kulit kentang hitam sebagai antioksidan seluler, makin tinggi kemampuannya dalam menghambat proliferasi sel kanker payudara MCF-7, yang ditunjukkan dengan semakin menurunnya jumlah sel hidup (Gambar 3 dan 4).

Kemampuan ekstrak etanol kulit kentang hitam mentah dan ekstrak etanol daging kentang hitam mentah sebagai anti-proliferasi berkaitan dengan potensi antioksidan seluler yang dapat menurunkan persentase SOR pada sel kanker payudara (MCF-7) yang diinduksi PMA. Potensi ekstrak etanol bagian kulit

dan daging kentang hitam mentah sebagai antioksidan seluler memiliki pengaruh menurunkan persentase SOR yang berdampak dalam menurunkan ekspresi *Nuclear factor-kB* (NF-kB) serta gen-gen lain yang dipengaruhi oleh NF-kB. Pengaruh penurunan SOR dan ekspresi NF-kB dapat menghambat proliferasi sel kanker payudara (MCF-7).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kentang hitam memiliki potensi sebagai antioksidan dan anti-proliferasi sel kanker *in vitro*, sehingga kentang hitam dapat dikembangkan menjadi makanan fungsional berbasis potensi lokal sebagai alternatif mencegah penyakit akibat stres oksidatif, seperti kanker payudara reseptor estrogen positif. Potensi mencegah penyakit akibat stres oksidatif seperti penyakit kanker payudara reseptor estrogen positif didukung oleh senyawa bioaktif di dalam kentang hitam yang telah diidentifikasi pada penelitian ini yaitu asam ursolat dan asam oleanolat.

KESIMPULAN

Ekstrak etanol daging dan kulit kentang hitam memiliki aktivitas antioksidan seluler yang dibuktikan dengan kemampuannya dalam menurunkan spesies oksigen reaktif (SOR). Konsentrasi optimum dalam menurunkan spesies oksigen reaktif ekstrak etanol daging kentang hitam 400 µg/mL dan ekstrak etanol kulit kentang hitam 200 µg/mL. Ekstrak etanol daging dan kulit kentang hitam memiliki kemampuan menghambat proliferasi sel kanker payudara MCF-7. Ekstrak etanol kulit kentang hitam memiliki kemampuan menghambat proliferasi lebih tinggi dibandingkan ekstrak etanol daging kentang hitam. IC_{50} ekstrak etanol daging kentang hitam 829.86 ± 5.73 µg/mL dan ekstrak etanol kulit kentang hitam 698.23 ± 1.61 µg/mL. Terdapat korelasi yang tinggi antara antioksidan seluler dan antiproliferasi. Korelasi aktivitas antioksidan seluler ekstrak etanol daging kentang hitam dan antiproliferasi adalah 0.93, sedangkan korelasi aktivitas antioksidan seluler ekstrak etanol kulit kentang hitam dan antiproliferasi adalah 0.98.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Departemen Pendidikan Nasional Direktorat Pendidikan Tinggi atas pembiayaan penelitian ini, Prof.drh.R.Wasito, M.Sc.,Ph.D atas saran dan masukan untuk penelitian ini; Tri Yuliaty, S.KM. (LPPT UGM) atas bantuannya dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Althunibat OY, Ridzwan Bin Hashim, Taher M, Daud JM, Ikeda MS, Zali BJ. 2009. *In vitro* antioxidant and antiproliferative activities of three Malaysian sea cucumber species. *Eur J Sci Res* 37: 376-387.

Arshad QK, Ahsana DA, Siddiqui B, Kabir N, Aslam H, Ahmet S, Erum S, Habib S, Begum S. 2010. Anticancer activity of *Ocimum basilicum* and the effect of ursolic acid on

cytoskeleton of MCF-7 human breast cancer cells. *Lett Drug Des Discov* 7: 726-736. DOI: 10.2174/1570180811007010726.

Borek C. 2004. Dietary antioxidant and human cancer. *Integr Cancer Ther* 3: 333-341. DOI: 10.1177/1534735404270578.

Chen GQ, Yao ZW, Zheng WP, Chen L, Duan H, She Y. 2010. Combined antitumor effect of ursolic acid and 5-fluorouracil on human esophageal carcinoma cell eca-109 *in vitro*. *Chin J Cancer Res* 22: 62-67. DOI: 10.1007/s11670-010-0062-3.

Chou CC, Yang JS, Lu HF, Ip SW, Lo C, Wu CC, Lin JP, Chung JG, Chou MJ. 2010. Quercetin-mediated cell cycle arrest and apoptosis involving activation of a caspase cascade through the mitochondrial pathway in human breast cancer MCF-7 cells. *Arch Pharm Res* 33: 1181-1191. DOI: 10.1007/s12272-010-0808-y.

Dekanski D, Janicijevic-Hudomal S, Ritic S, Radonji NV, Petronijevic ND, Piperski V, Mitrovic DM. 2009. Attenuation of cold restraint stress-induced gastric lesions by an olive leaf extract. *Gen Physiol Biophys* 28: 135-142.

Duval RE, Harmand PO, Jayat-Vignoles C, Cook-Moreau J, Pinon A, Delage C, Simon A. 2008. Differential involvement of mitochondria during asam ursolat-induced apoptotic process in HaCaT and M4Beu cells. *Oncol Rep* 19: 145-149.

Feng JH, Chen W, Zhao Y, Ju XL. 2009. Anti-tumor activity of oleanolic, ursolic and glycyrrhethinic acid. *Open Nat Prod J* 2: 48-52. DOI: 10.2174/1874848100902010048.

Giovannini C, Scazzocchio B, Matarrese P, Vari R, D'Archivio M, Benedetto RD, Casciani S, Dessi MR, Straface E, Malorni W, Masella R. 2008. Apoptosis induced by oxidized lipids is associated with up-regulation of p66Shc in intestinal Caco-2 cells: protective effects of phenolic compounds. *J Nutr Biochem* 19: 118-128. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2007.01.010.

Hogan S, Chung H, Zhang L, Li J, Lee YW, Dai Y, Zhou K. 2010. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from acai. *Food Chem* 118: 208-214. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.04.099.

Hsum YW, Yew WT, Hong PLV, Soo KK, Hoon LS, Chieng YC, Mooi LY. 2008. Identification and Evaluation of Potential Anti-Tumor Promoting Compounds from Tubers of *Coleus tuberosus*. *International PSE Symposium On Natural Products in cancer Therapy*, 23-26 September 2008. Naples Italy.

Hsum YW, Yew TW, Hong PLV, Soo KK, Hoon LS, Chieng YC, Mooi LY. 2011. Cancer chemopreventive activity of asam maslinat: suppression of COX - 2 expression and inhibition of NF-kB and AP-1 activation in *Raji* cells. *Planta Med* 77: 152-157. DOI: 10.1055/s-0030-1250203.

Kwon SH, Park HY, Kim JY, Jeong IY, Lee MK, Seo KI. 2010. Apoptotic action of ursolic acid isolated from *Corni fructus* in RC-58T/hSA#4 primary human prostate cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett* 22: 6435-6438. DOI: 10.1016/j.bmcl.2010.09.073.

- Jeong JH, An JY, Kwon YT, Rhee JG, Lee YJ. 2009. Effects of low dose quercetin: Cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. *J Cell Biochem* 106: 73-82. DOI: 10.1002/jcb.21977.
- Li Y, Xing D, Chen Q, Chen WR. 2010. Enhancement of chemotherapeutic agent-induced apoptosis by inhibition of NF- κ B using ursolic acid. *Int J Cancer* 127: 462-473. DOI: 10.1002/ijc.25044.
- Liu RH, Finley J. 2005. Potential cell culture models for antioxidant research. *J Agr Food Chem* 53: 4311-4314. DOI: 10.1021/jf058070i.
- Lopez-Lazaro M. 2007. Dual role of hydrogen peroxide in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer Lett* 252: 1-8. DOI: 10.1016/j.canlet.2006.10.029.
- Manda G, Nechifor MT, Neagu TM. 2009. Reactive oxygen species, cancer and anti-cancer therapies. *Curr Chem Biol* 3: 22-46. DOI: 10.2174/187231309787158271.
- Manu KA, Kuttan G. 2008. Ursolic acid induces apoptosis by activating p53 and caspase-3 gene expressions and suppressing NF- κ B mediated activation of bcl-2 in B16F-10 melanoma cells. *Int Immunopharmacol* 8: 974-981. DOI: 10.1016/j.intimp.2008.02.013.
- Martin KR. 2007. Targeting apoptosis with dietary bioactive agents. *Exp Biol M* 231: 117-129.
- Mooi LY, Ali AM, Norhanom AB, Salleh KM, Murakami A, Koshimizu K. 1999. Anti-tumor promoting activity of some Malaysian traditional vegetables (Ulam). *Nat Prod Sci* 5: 33-38.
- Mooi LY, Wahab NA, Lajis NH, Ali AM. 2010. Chemopreventive properties of phytosterols and asam maslinat extracted from *Coleus tuberosus* in inhibiting the expression of EBV early-antigen in *Raji* cells. *Chem Biodivers* 7: 1267-1275. DOI: 10.1002/cbdv.200900193.
- Muanda FN, Bouayed J, Djilani A, Yao C, Soulimani R, Dicko A. 2011. Chemical composition and, cellular evaluation of the antioxidant activity of *Desmodium adscendens* leaves. *Evid-Based Compl Alt* 2011: 1-9. DOI:10.1155/2011/620862.
- Nisa S, Bibi Y, Waheed A, Zia M, Sarwar S, Ahmed S, Chaudhary MF. 2011. Evaluation of anticancer activity of *Debregeasia Salicifolia* extract against estrogen receptor positive cell line. *Afr J Biotechnol* 10: 990-995.
- Nugraheni M, Santoso U, Suparmo, Wuryastuti H. 2011. Potential of *Coleus tuberosus* as an antioxidant and cancer chemoprevention agent. *Int Food Res J* 18: 1471-1480.
- Obinaju, Blessing E, Martin, Franchis L. 2010. Dose-related effects of quercetin in the human breast carcinoma MCF-7 cell line. *Am J Sci Ind Res* 1: 242-261. DOI: 10.5251/ajsir.2010.1.2.242.261.
- Opata MM, Izevbogie EB. 2006. Aqueous *Vernonia amigdalina* extracts alter MCF-7 cell membrane permeability and efflux. *Int J Environ Res* 3: 174-179.
- O'Sullivan AM, O'Callaghan, O'Grady MN, Quequeneur B, Hanniffy D, Troy DJ, Kerry JP, O'Brien NM. 2011. *In vitro* and cellular antioxidant activities of seaweed extracts prepared from five brown seaweeds harvested in spring from the west coast of Ireland. *Food Chem* 126: 1064-1070. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.11.127.
- Ovesna Z, Kozics K, Slamena D. 2006. Protective effects of ursolic acid and oleanolic acid in leukemic cells. *Mutation Res* 600: 131-137. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2006.03.008.
- Pathak AK, Bhutani M, Nair AS, Ahn KS, Chakraborty A, Kandungana H, Guha S, Sethil G, Aggarwal BB. 2007. Ursolic acid inhibits STAT3 activation pathway leading to suppression of proliferation and chemosensitization of human multiple myeloma cells. *Mol Cancer Res* 5: 943-955. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-06-0348.
- Prades J, Vogler O, Alemany R, Gomez-Florit M, Funari SS, Ruiz-Guiterrez V, Barcelo F. 2011. Plant triterpenic acid as modulators of lipid membran physical properties. *Biochim Biophys Acta* 1808: 752-760. DOI: 10.1016/j.bbamem.2010.12.007.
- Salawu SO, Akindahunsi AA, Sanni DM, Decorti G, Cvorovic J, Tramer F, Passamonti S, Mulinacci N. 2011. Cellular antioxidant activities and cytotoxic properties of ethanolic extracts of four tropical green leafy vegetables. *Afr J Food Sci* 5: 267-275.
- Shan JZ, Xuan YY, Zheng S, Dong Q, Zhang SZ. 2009. *Ursolic acid* inhibits proliferation and induces apoptosis of HT-29 colon cancer cells by inhibiting the EGFR/MAPK pathway. *J Zhejiang Univ-Sci B* 10: 668-674. DOI: 10.1631/jzus.B0920149.
- Shyu MH, Kao TC, Yen GC. 2010. Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in HuH7 human hepatocellular carcinoma cells through a mitochondrial-dependent pathway and down regulation of XIAP. *J Agr Food Chem* 58: 6110-6118. DOI: 10.1021/jf100574j.
- Waris G, Ahsan H. 2006. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog* 11: 1-8. DOI: 10.1186/1477-3163-5-14.
- Wolfe K, Liu RH. 2007. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *J Agr Food Chem* 55: 8896-8907. DOI: 10.1021/jf0715166.
- Wolfe K, Liu RH. 2008. Structure-activity relationships of flavonoids in the cellular antioxidant activity assay. *J Agr Food Chem* 56: 8404-8411. DOI: 10.1021/jf8013074.
- Verma AR, Vijayakumar M, Mathela CS, Rao CV. 2009. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of different fractions of *Moringa oleifera* leaves. *Food Chem Toxicol* 47: 2196-2201. DOI: 10.1016/j.fct.2009.06.005.
- Vivancos M, Moreno JJ. 2008. Effect of resveratrol, tyrosol and β -sitosterol on oxidised low-density lipoprotein-stimulated oxidative stress, arachidonic acid release and prostaglandin E₂ synthesis by RAW 264.7 macrophages. *Brit J Nutr* 99: 1199-1207. DOI: 10.1017/S0007114507876203.
- Yamaguchi H, Noshita T, Kidachi Y, Umetsu H, Hayachi M, Komiyama K, Funayama S, Ryoyama K. 2008. Isolation of ursolic acid from apple peels and its specific efficacy as a

- potent anti tumor agent. J Health Sci 54: 54-660. DOI: 10.1248/jhs.54.654.
- Yang L, Liu X, Lu Z, Yuet-Wa CJ, Zhou L, Fung KP, Wu S, 2010. Ursolic acid induces doxorubicin-resistant HepG2 cell death via the release of apoptosis-inducing factor. Cancer Lett 298: 128-138. DOI: 10.1016/j.canlet.2010.06.010.
- Yasukawa K, Kitanoka S, Kawata K, Gotu K. 2009. Anti tumor promoters phenolics and triterpenoid from *Hippophae rhamnoides*. Fitoterapia 80: 164-167. DOI: 10.1016/j.fitote.2009.01.006.
- Yusharmen D. 2010. Jika Tidak Dikendalikan 26 Juta Orang di Dunia Menderita Kanker. Disampaikan dalam Seminar Sehari Memperingati Hari Kanker Sedunia. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Wang X, Li L, Wang B, Xiang J. 2009. Effects of ursolic acid on the proliferation and apoptosis of human ovarian cancer cells. Medicine J Huazhong Univ Sci-Med 29: 761-764. DOI 10.1007/s11596-009-0618-y.
- Zhao CR, Gao ZH, Qu XJ. 2010. NRF2-ARE signaling pathway and natural products for cancer chemoprevention. Cancer Epidemiol 34: 523-533. DOI: 10.1016/j.canep.2010.06.012.