

## Uji Sitotoksisitas Ekstrak Etanol Terpurifikasi Daun *Arcangelisia Flava* pada Sel Kanker Payudara MCF-7 (Cytotoxicity Assay of Purified Ethanol Extract of *Arcangelisia flava* Leaves on Breast Cancer Cells MCF-7)

Yora Utami, Endah Puspitasari, Dian Agung Pangaribowo  
Fakultas Farmasi, Universitas Jember  
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121  
e-mail korespondensi: yora.utami1@gmail.com

### **Abstract**

*Breast cancer is a malignant tumor that grows in the breast cells. The prevalence of cancer in Indonesia are about 1.4% and breast cancer is the number two cause of death for women. Cancer treatment side effects using natural materials are relatively small and safe. Arcangelisia flava plant contains alkaloids protoberberin compound, consists of berberine, palmatin, and jatrorrhizin. Berberine has anticancer activity. This compound has capability to inhibit the growth of breast cancer cells MCF-7 and MDA-MB-231. This study aimed to determine the potential of purified ethanol extract of A. flava as anticancer agents in single use through cytotoxicity assay. The purified ethanol extract of A. flava using MTT method is used to obtain the IC<sub>50</sub> value. The IC<sub>50</sub> values obtained an average of 3 experiments which amounted to 1,829.84 ± 288.2 µg/ml. The IC<sub>50</sub> values obtained showed that the purified extract of A. flava did not have a potential as a cytotoxic agent on breast cancer cells as the IC<sub>50</sub> values obtained was more than 1,000 µg/ml.*

**Keywords:** *Arcangelisia flava*, MCF-7 cells, cytotoxic

### **Abstrak**

Kanker payudara merupakan tumor ganas yang tumbuh di sel-sel payudara. Prevalensi penyakit kanker di Indonesia sebesar 1,4% dan kanker payudara menjadi penyebab kematian nomor dua pada wanita. Pengobatan penyakit kanker dengan efek samping yang relatif kecil dan aman adalah dengan menggunakan bahan alam. Tumbuhan *Arcangelisia flava* memiliki kandungan senyawa golongan alkaloid protoberberin, yang terdiri dari berberin, palmatin, dan jatrorrhizin. Berberin memiliki banyak aktivitas yang mendukung sebagai antikanker. Senyawa ini mampu menghambat pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7 dan MDA-MB-231. Penelitian ini bertujuan mengetahui potensi ekstrak etanol terpurifikasi *A. flava* sebagai agen antikanker dalam penggunaan tunggal melalui uji sitotoksisitas. Ekstrak etanol terpurifikasi *A. flava* menggunakan metode MTT untuk memperoleh IC<sub>50</sub>. Dari hasil penelitian, diperoleh nilai IC<sub>50</sub> rata-rata dari 3 eksperimen yaitu sebesar 1829,84 ± 288,2 µg/ml. Nilai IC<sub>50</sub> yang diperoleh menunjukkan bahwa ekstrak *A. flava* terpurifikasi tidak memiliki potensi yang baik sebagai agen sitotoksik pada sel kanker payudara karena nilai IC<sub>50</sub> yang didapatkan lebih dari 1.000 µg/ml.

**Kata kunci:** *Arcangelisia flava*, sel MCF-7, sitotoksik

### **Pendahuluan**

Kanker adalah salah satu penyakit yang sangat sulit ditangani dan menjadi penyebab kurang lebih 13% kematian di seluruh dunia. Pada tahun 2012, terdapat 14,1 juta kasus kanker dan diperkirakan akan terus meningkat sampai tahun

2030 menjadi 23,6 juta kasus setiap tahunnya [1]. Kanker payudara merupakan tumor ganas yang tumbuh di sel-sel payudara. Tumor ganas adalah sekelompok sel kanker yang dapat tumbuh menjadi jaringan sekitarnya atau menyebar ke organ tubuh lain [2].

Pengobatan penyakit kanker dengan efek samping yang relatif kecil dan aman adalah dengan menggunakan bahan alam. Penggunaan senyawa alam, sintesis atau agen biologis kimia untuk membalikkan, menekan atau mencegah progresi karsinogenik hingga menjadi kanker yang invasif disebut dengan agen kemoprevensi [3].

Tumbuhan *Arcangelisia flava* (*A. flava*) memiliki kandungan senyawa golongan alkaloid protoberberin, yang terdiri dari berberin, palmatin, dan jatrorrhizin. Berberin memiliki banyak aktivitas yang mendukung sebagai antikanker. Senyawa ini mampu menghambat pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7 dan MDA-MB-231 [4].

Manfaat obat herbal dapat ditingkatkan dengan cara membuat ekstrak terpurifikasi, ekstraksi selektif diharapkan akan menghasilkan senyawa-senyawa berkhasiat dan membatasi kemungkinan zat balast yang ikut tersari [5]. Penelitian ini diharapkan untuk mengetahui efek sitotoksik dari ekstrak terpurifikasi daun *A. flava* terhadap sel MCF-7. Uji sitotoksik dilakukan dengan menggunakan metode MTT. Uji selektivitas juga dilakukan untuk mengetahui apakah ekstrak tersebut lebih selektif terhadap sel kanker daripada sel normal. Uji selektivitas dapat dilakukan ketika hasil dari uji sitotoksik sel kanker memenuhi syarat yaitu nilai IC<sub>50</sub> yang didapatkan kurang dari 1.000 µg/ml [6].

## Metode Penelitian

### Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *rotary evaporator* (Heidolph-4000), oven, dan corong *buchner*. Penelitian uji sitotoksitas *in vitro* membutuhkan *inverted microscope* (Zeiss), *autoclave*, *class II biosafety cabinet*, *haemocytometer*, *cell counter*, mikropipet, *ELISA reader* (SLT 240 ATC), inkubator CO<sub>2</sub> (Heraceus) dan *centrifuge*.

Bahan yang di gunakan adalah daun *A. flava*, daun yang digunakan diperoleh dari koleksi Taman Nasional Meru Betiri, etanol 70%, DMSO (Gibco), Kultur sel kanker payudara (sel MCF-7), kultur sel normal (sel Vero), media kultur *Dulbecco's Modified Eagle Media* (Gibco), media kultur M199 (Gibco), *fetal bovineserum* (Gibco), antibiotika penisilin-streptomisin 1% (Gibco), tripsin-EDTA 0,25% (Gibco), PBS (Sigma), 96 *well plate* (Nunc), Pereaksi MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida] (Sigma), pereaksi *stopper* yang mengandung natrium dodesil sulfat (SDS) (Sigma) 10% dalam 0,1 N HCl (Merck).

### Prosedur Penelitian Pembuatan Ekstrak

Artikel Ilmiah Hasil Penelitian Mahasiswa 2015

Pada penelitian ini, daun *A. flava* disortir dan dijemur dengan diangin-anginkan hingga kering, kemudian diserbuk dan diayak. Sebanyak 100 g serbuk daun kering diekstraksi dengan *n*-heksana diulang sebanyak 3 kali, kemudian ampas dimaserasi dengan kloroform diulang sebanyak 3 kali, ampas yang diperoleh kemudian dimaserasi kembali dengan etanol 70 %. Ekstrak etanol kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dan dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C. Ekstrak etanol terpurifikasi *A. flava* selanjutnya dibuat sediaan suspensi dalam 0,5 % DMSO untuk uji *in vitro* .

### Preparasi Kultur Sel

Sel diambil dari tangki nitrogen cair, kemudian sel tersebut dicairkan. Menyemprot ampul dengan etanol 70% dan dimasukkan ke dalam LAF. Ampul dibuka dan sel dipindahkan ke dalam *conical tube* steril baru yang berisi media kultur. Suspensi sel disentrifugasi dengan kecepatan 600 rpm selama 5 menit, dan supernatan yang dihasilkan kemudian dibuang. Media kultur yang baru ditambahkan pada endapan sel dan disuspensikan perlahan hingga homogen. Selanjutnya sel ditumbuhkan dalam beberapa buah *tissue culture dish* dan diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> pada suhu 37°C dan aliran CO<sub>2</sub> 5%. Dua puluh empat jam kemudian dilakukan penggantian media kultur, selanjutnya sel ditumbuhkan hingga konfluen, dan jumlahnya cukup untuk penelitian. Setelah sel konfluen, media dibuang dan sel dicuci dengan PBS dua kali. Sel ditambah tripsin 0,25% untuk melepas sel dari *tissue culture dish* dan dilakukan inkubasi selama 3 menit dalam inkubator CO<sub>2</sub>. Media ditambahkan ke dalam *tissue culture dish* dan sel diresuspensi hingga terlepas semua dari dinding *tissue culture dish*. Suspensi sel kemudian dipindahkan ke dalam *conical tube* steril baru. Sel dihitung dengan *haemocytometer* dan *cell counter* lalu dibuat suspensi sel dengan konsentrasi sel sesuai dengan kebutuhan.

### Preparasi sampel

Sampel ditimbang lebih kurang 20 mg dengan seksama di dalam *microtube*. Sampel tersebut ditambahkan 0,1 ml DMSO (200.000 µg/ml) dan dilarutkan dengan bantuan vortex. Dari larutan dengan kadar 200.000 µg/ml, dibuat seri kadar sampel dengan konsentrasi 100, 200, 400, 700, dan 1.000 µg/ml.

### Uji Sitotoksik Metode MTT

Mengamati kondisi sel dari inkubator CO<sub>2</sub>. Setelah itu, sel dipanen dan dihitung jumlah selnya untuk dapat membuat pengenceran sel dengan media kultur sesuai dengan penghitungan sel. Sel ditransfer ke dalam sumuran, masing-masing sumuran sebesar 100 µl. Setiap kali mengisi 12 sumuran, resuspensi

kembali sel agar tetap homogen. Disisakan 3 sumuran kosong sebagai kontrol media. Keadaan sel diamati menggunakan mikroskop untuk melihat distribusi sel. Sel diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam. Perlakuan sel dengan sampel dilakukan setelah sel kembali pada keadaan normal. Setelah sel normal kembali, kemudian membuat seri konsentrasi sebesar 100, 200, 400, 700, dan 1.000 µg/ml. *Plate* yang telah berisi sel MCF-7 dari inkubator dibuang media selnya dan memasukkan 100 µl PBS ke dalam semua sumuran yang terisi sel, kemudian PBS dibuang. Sisa cairan dalam sumuran ditiriskan dengan tisu. Setelah itu dimasukkan seri konsentrasi sampel ke dalam sumuran secara triplo dan diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam. Kemudian, membuang media sel, setelah itu pipet 100 µl PBS tuangkan pada setiap sumuran dalam *plate*, kemudian tambahkan reagen MTT sebesar 100 µl ke setiap sumuran, termasuk kontrol media. Sel diinkubasi selama 2-4 jam di dalam inkubator (sampai terbentuk formazan). Kondisi sel diamati dengan menggunakan mikroskop *inverted*. Jika formazan telah jelas terbentuk, ditambahkan *stopper* SDS 10% dalam 0,1 N HCl. Setelah itu *plate* dibungkus dengan kertas dan diinkubasi di tempat gelap dengan suhu ruangan. Masing-masing sumuran dibaca absorbansinya dengan menggunakan ELISA reader  $\lambda=595\text{ nm}$  [7]

### Analisis data

#### Uji Sitotoksitas Menggunakan MTT Assay

Data yang diperoleh berupa absorbansi masing-masing sumuran kemudian dikonversi ke dalam persen viabilitas sel. Persentase viabilitas sel dihitung menggunakan persamaan berikut.

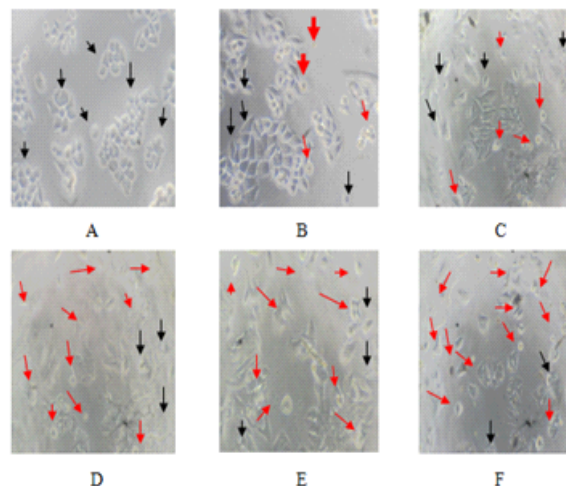
$$\text{Viabilitas sel (\%)} = \frac{(\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media})}{(\text{Absorbansi kontrol negatif} - \text{Absorbansi kontrol media})} \times 100\%$$

Disajikan grafik konsentrasi senyawa uji dan viabilitas sel sebagai data yang menentukan liniernya suatu eksperimen. Aktivitas sitotoksik dinyatakan dengan  $IC_{50}$  (konsentrasi yang menyebabkan kematian 50 % populasi sel). Jika koefisien korelasi hitung lebih besar daripada koefisien korelasi tabel ( $n=5, p=0,05$ ), maka  $IC_{50}$  dapat dihitung berdasarkan persamaan regresi linier dari grafik konsentrasi senyawa uji dan viabilitas sel.  $IC_{50}$  merupakan konsentrasi yang menyebabkan penghambatan pertumbuhan 50% populasi hingga dapat diketahui potensi sitotoksitasnya.

### Hasil Penelitian

Hasil uji sitotoksitas dengan metode MTT menghasilkan data absorbansi dan dihitung persentase

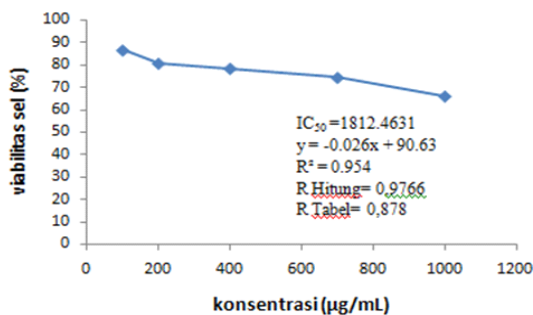
sel hidupnya. Pengamatan morfologi sel dilakukan di bawah mikroskop *inverted*. Perbedaan morfologi pada sel kanker payudara dengan semakin tingginya konsentrasi ekstrak yang diberikan ditunjukkan pada Gambar 4.1. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang diberikan maka semakin banyak pula sel yang mengalami kematian. Sel yang hidup tampak memiliki bentuk yang panjang dan juga melekat di dasar *plate*, sedangkan sel yang mati berbentuk bulat kecil dan mengapung.



Gambar 1 : Morfologi sel MCF-7 di bawah mikroskop

*Inverted*, A control sel; B 100µg/ml; C 200 µg/ml; D 400 µg/ml; E 700 µg/ml; F 1000 µg/ml. keterangan ( ) sel hidup; ( ) sel mati.

Uji sitotoksik ekstrak terpurifikasi daun *A. flava* terhadap sel kanker payudara memberikan hasil berupa penurunan jumlah sel hidup seiring dengan peningkatan kadar. Semakin tinggi konsentrasi, maka semakin rendah jumlah sel hidup (Gambar 1). Pada konsentrasi larutan uji 100 µg/ml menunjukkan presentase hidup sebesar 86,47 %; 200 µg/ml sebesar 80,53 %; 400 µg/ml 78,25 %; 700 µg/ml sebesar 74,17 %; 1.000 µg/ml sebesar 65,81 %.



Gambar 2: Hasil uji sitotoksitas ekstrak terpurifikasi *A. flava* terhadap sel kanker payudara MCF-7 dengan metode MTT dan inkubasi selama 24 jam.

Gambar 2 menunjukkan bahwa nilai R hitung (0,9766) lebih besar dari nilai R tabel (0,878). Oleh karena itu, nilai  $IC_{50}$  dapat dihitung dengan regresi linier, berdasarkan data konsentrasi ekstrak terpurifikasi daun *A. flava* dan presentase sel hidup yang diperoleh dari 3 eksperimen. Nilai  $IC_{50}$  rata-rata dari 3 eksperimen yaitu sebesar  $1.829,84 \pm 288,2$  µg/ml.

### Pembahasan

Berdasarkan nilai  $IC_{50}$  dapat dikatakan bahwa ekstrak etanol terpurifikasi *A. flava* tidak memiliki efek sitotoksik karena nilai  $IC_{50} > 1000$  µg/ml. Penggunaan ekstrak etanol terpurifikasi diduga memiliki pengaruh besar, sehingga senyawa berberin atau senyawa lain yang berpotensi sebagai pemicu sitotoksik dalam ekstrak terpurifikasi lebih sedikit, akibatnya efek yang ditimbulkan kurang efektif.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan sebelumnya, berberin memberikan efek penghambatan pada proliferasi dan reproduksi mikroorganisme tumorigenik tertentu, memiliki inhibitor enzim yang dapat mempengaruhi N-asetiltransferase, siklooksigenase-2 dan topoisomerase pada ekspresi gen/protein serta menurunkan pertumbuhan tumor dan juga metastasis sel. Efek antiproliferasi berberin terhadap sel MCF-7 mempunyai  $IC_{50}$  sebesar 20 µmol/l [8]. Ekstrak metanol kulit batang *A. flava* memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel MCF-7 dengan  $IC_{50}$  sebesar  $7,7 \pm 0,6$  µg/ml [9]. Kadar berberin yang ada pada kulit batang sebesar  $0,31 \pm 0,04$  % b/b [10].

Ekstrak etanol tumbuhan *A. flava* juga dapat memberikan efek penghambatan terhadap proliferasi sel HeLa dengan  $IC_{50}$  sebesar 49,96 µg/ml. Ekstrak etanol total daun *A. flava* memiliki efek sitotoksik

yang selektif terhadap sel kanker payudara MCF-7 dibandingkan sel normal dengan  $IC_{50}$   $136 \pm 17$  µg/ml dan SI 9,85 [11] dan pada penelitian ini memiliki Nilai  $IC_{50}$  rata-rata dari 3 eksperimen yaitu sebesar  $1.829,84 \pm 288,2$  µg/ml.

Hal ini dapat disebabkan karena proses ekstraksi dan pelarut yang dilakukan berbeda sehingga senyawa berberin atau senyawa lain yang berpotensi sebagai pemicu sitotoksik dalam ekstrak terpurifikasi lebih sedikit, sehingga efek yang ditimbulkan kurang efektif. Namun demikian, tidak menutup kemungkinan penggunaan ekstrak terpurifikasi *A. flava* dalam bentuk kombinasi dengan agen kemoterapi yang lainnya. Terapi kombinasi pada pengobatan kanker diterapkan untuk meningkatkan efektivitas dan menurunkan efek samping. Pengujian kombinasi ekstrak terpurifikasi *A. flava* dimungkinkan dapat menghasilkan efektivitas yang tinggi dengan efek samping yang lebih rendah.

### Simpulan dan Saran

Ekstrak etanol terpurifikasi *A. flava* tidak memiliki potensi sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 karena memiliki nilai  $IC_{50}$  sebesar  $1829,84 \pm 288,2$  µg/ml. Uji selektivitas tidak dilakukan karena hasil dari uji sitotoksik sel kanker tidak memenuhi syarat yaitu nilai  $IC_{50}$  yang didapatkan lebih dari 1.000 µg/ml. Untuk penelitian lebih lanjut, penulis menyarankan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai uji kombinasi antara ekstrak terpurifikasi *A. flava* dan agen kemoterapi lainnya.

### Daftar Pustaka

- [1] World Health Organization. World cancer factsheet. International Agency for Research on Cancer. 2014
- [2] American Cancer Society.[internet] Breast cancer.: 2015 [cited 2015 april 29] Available from [http://www.cancer.org/acs/groups/\\_/cid/documents/webcontent/003090-pdf.pdf](http://www.cancer.org/acs/groups/_/cid/documents/webcontent/003090-pdf.pdf). [diakses tanggal 29 April 2015].
- [3] Tsao, Anne S, Kim, Edward, Hong, Waun Ki. Chemoprevention of cancer, CA Cancer J Clin. 2004. 54 : 150-180.
- [4] Kim JB, Yu JH, Ko E, Lee KW, Song AK, Park SY, Shin I, Han W, and Noh DY . The alkaloid berberine inhibits the growth of anoikis-resistant MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines by inducing cell cycle arrest. Phytomedicine. 2010. 17: 436-440.

- [5] Harsini, Widjajono. Majalah herbal kedokteran gigi. Yogyakarta : Universitas Yogyakarta : 2008.
- [6] Omoregie ES, and Sisodia BS. In vitro antiplasmodial activity and cytotoxicity of leaf extracts of *Jatropha Tanjorensis* J.L. Ellis and Soroja. Bajopas, 2012. 5(1): 90 – 97.
- [7] Sinaga E, Suprihatin, Wiryanti, I. 2011. Perbandingan Daya Sitotoksik Ekstrak Rimpang 3 Jenis Tumbuhan Zingiberaceae Terhadap Sel Kanker MCF-7. Jurnal Farmasi Indonesia, 5(3): 125-133.
- [8] Sun Y, Xun K, Wang Y, Chen, Xiuping. A Systematic Review of the anticancer properties of berberine. a natural product from Chinese herbs. Anti-Cancer Drugs. 2009. 20: 757-769.
- [9] Keawpradub N, Dej-adisai S, and Yuenyongsawad, S. Antioxidant and cytotoxic activities of Thai medicinal plants named khaminkhruea: *Arcangelisia flava*, *Coscinu blumeanum*, and *Fibraurea tinctoria*. Songklanakarin J. Sci. Technol. 2005. 27 (Suppl. 2): 455-467.
- [10] Ulfa E.U, Rachmawati E. Standarisasi ekstrak batang kayu kuning (*Arcangelisia flava*). Seminar Nasional Current Challenges in Drug Use and Development. Jember. 2015.
- [11] Puspitasari E, Pangaribowo D.A, Isparaning I, Utami, Y. Ethanolic extract of *Arcangelisia flava* leaves is cytotoxic and selective against cervical breast, and colon cancer lines. The 1<sup>st</sup> UMP Pharmacy International Conference. 2015.