

Uji Sitotoksisitas Ekstrak Etanol Daun *Arcangelisia flava* pada Sel Kanker Payudara MCF-7  
(*Cytotoxicity Assay of Ethanol Extract of Arcangelisia flava Leaf on MCF-7 reast cancer cells*)

Ika Yanuar Isparnaning, Endah Puspitasari, Dian Agung Pangaribowo  
Fakultas Farmasi Universitas Jember  
Jln. Kalimantan No. 37, Jember 68121  
e-mail korespondensi: ukhtiikafarmasi@gmail.com

**Abstract**

Breast cancer disease in Indonesia had the highest incidence in 2012, which was amounted to 43.3 % and the percentage of deaths from breast cancer was 12.9 %. The current therapy often use to treat cancer are chemotherapy and radiation. Failure on cancer therapy can be caused due to drug resistance and toxicity. Therefore, it is necessary to develop new drugs, e.g. by screening natural substances. One of the plants that potential for anti-cancer therapy is a *A. flava*. The leaves in plants *Arcangelisia flava* contains protoberberin alkaloid class of compounds, consisting of berberine, palmatin, and jatrorrhizin. Berberine has a lot of support as anticancer activity. The purpose of this study was to determine the potential of ethanol extract of *A. flava* as cytotoxic agent using MTT assay. Ethanol extract of leaves of *A. flava* had potential as a chemoprevention agent based cytotoxic activity against MCF-7 breast cancer cell line with  $IC_{50}$  value of  $135.74 \pm 16.82 \mu\text{g/ml}$ .

**Keywords:** breast cancer, *A. flava*, cytotoxicity

**Abstrak**

Penyakit kanker payudara di Indonesia memiliki presentase kejadian tertinggi pada tahun 2012, yaitu sebesar 43,3% dan persentase kematian akibat kanker payudara sebesar 12,9%. Saat ini terapi yang sering digunakan untuk mengobati penyakit kanker adalah kemoterapi dan radiasi. Kegagalan terapi pada kanker dapat disebabkan karena resistensi obat dan toksisitas. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengembangan obat baru yang memiliki efek samping yang relatif lebih kecil, salah satunya yaitu dengan melakukan skrining bahan alam. Salah satu tumbuhan yang memiliki potensi untuk terapi antikanker adalah *Arcangelisia flava*. Bagian daun pada tumbuhan *A. flava* memiliki kandungan senyawa golongan alkaloid protoberberin, yang terdiri dari berberin, palmatin, dan jatrorrhizin. Berberin memiliki banyak aktivitas yang mendukung sebagai antikanker. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui potensi ekstrak etanol *A. flava* sebagai agen sitotoksik menggunakan metode penelitian MTT. Ekstrak etanol daun *A. flava* memiliki potensi sebagai agen kemoprevensi berdasarkan aktivitas sitotoksiknya terhadap sel kanker payudara MCF-7 dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar  $135,74 \pm 16,82 \mu\text{g/ml}$ .

**Keywords:** kanker payudara, *A. flava*, sitotoksisitas

**Pendahuluan**

Menurut Badan Internasional Penelitian Kanker, kasus penderita kanker mengalami peningkatan dari 12,7 juta pada tahun 2008 menjadi 14,1 juta pada tahun 2012. Salah satu jenis kanker yang terjadi hampir seluruhnya pada wanita adalah kanker payudara. Penyakit kanker payudara di Indonesia memiliki presentase tertinggi pada tahun 2012, yaitu sebesar 43,3% dan persentase kematian akibat kanker payudara sebesar 12,9% [1]. Kanker payudara merupakan kanker yang terbentuk di jaringan payudara [2].

Saat ini terapi yang sering digunakan untuk

mengobati penyakit kanker adalah kemoterapi dan radiasi. Kegagalan terapi pada kanker dapat disebabkan karena resistensi obat dan toksisitas [3]. Bentuk toksisitas dari obat kanker adalah menurunnya imunitas tubuh. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengembangan obat baru yang memiliki efek samping yang relatif kecil serta selektif terhadap sel kanker, salah satunya yaitu dengan melakukan skrining bahan alam [4]. Salah satu tumbuhan yang memiliki potensi untuk terapi antikanker adalah kayu kuning (*Arcangelisia flava*). Bagian daun pada tumbuhan *A. flava* memiliki kandungan senyawa golongan alkaloid protoberberin, yang terdiri dari berberin, palmatin, dan jatrorrhizin. Berberin

memiliki banyak aktivitas yang mendukung sebagai antikanker [5].

## Metode Penelitian

### Pembuatan ekstrak etanol *A. flava*

Pada penelitian ini, daun *A. flava* disortir dan dijemur dengan diangin-anginkan hingga kering, kemudian dijadikan serbuk dan diayak. Sebanyak 250 g serbuk daun kering diekstraksi dengan etanol sebanyak 3 kali ulangan. Ekstrak etanol kemudian dipisahkan menggunakan *rotary evaporator* dan dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C. Ekstrak etanol *A. flava* selanjutnya dibuat sediaan suspensi dalam 0,1 ml 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. Cairan 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 merata, dan jumlahnya cukup untuk penelitian. Setelah sel merata, media dibuang dan sel dicuci dengan 100 µg/ml 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 DMEM 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 saksama di dalam *microtube*. Sampel tersebut ditambahkan 0,1 ml DMSO (200.000 µl/ml) dan dilarutkan dengan bantuan vortex. Dari larutan dengan kadar 200.000 µl/ml di atas, dibuat seri kadar sampel dengan konsentrasi 100 µl/ml, 200 µl/ml, 400 µl/ml, 700 µl/ml, dan 1000 µl/ml dan diencerkan dalam DMSO.

### Uji sitotoksik metode MTT

Mengamati kondisi sel dari inkubator CO<sub>2</sub>.

*Artikel Ilmiah Hasil Penelitian Mahasiswa 2015*

Setelah itu, sel di panen 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 µl/ml, 200 µl/ml, 400 µl/ml, 700 µl/ml, dan 1000 µl/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, media sel dibuang, dicuci PBS 1 kali, dan ditambahkan 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 λ=595 nm [6].

### 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 3.

$$SI = \frac{IC_{50} \text{ sel Normal Vero}}{IC_{50} \text{ sel Kanker Payudara MCF-7}} \times 100 \% \quad (1)$$

Disajikan grafik konsentrasi senyawa uji dan viabilitas sel sebagai data yang menentukan liniernya suatu eksperimen. Aktivitas sitotoksik dinyatakan dengan IC<sub>50</sub> (konsentrasi yang menyebabkan kematian 50 % populasi sel) yang dianalisis dengan analisis probit. IC<sub>50</sub> merupakan konsentrasi yang menyebabkan penghambatan pertumbuhan 50% populasi sel sehingga dapat diketahui potensi sitotoksitasnya [7].

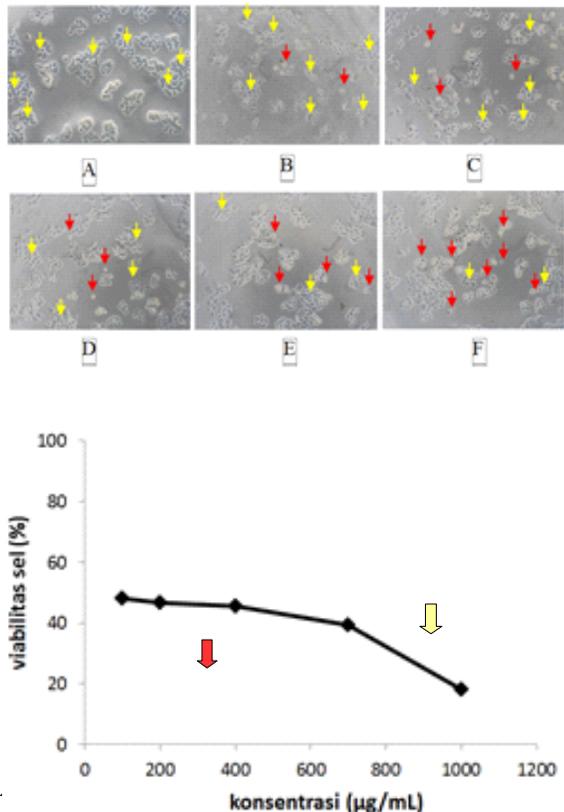
## Hasil Penelitian

Pada penelitian ini, didapatkan ekstrak etanol daun *A. flava* sebesar 16,1 gram dengan rendemen sebesar 16,1% b/b dari 100 gram simplisia. Ekstrak etanol daun *A. flava* diuji aktivitas sitotoksiknya

terhadap sel kanker payudara dengan seri konsentrasi yang berbeda.

Uji sitotoksisitas dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode MTT. Tujuan dilakukannya uji sitotoksisitas adalah untuk mengetahui potensi ketoksikan ekstrak etanol daun *A. flava* terhadap sel kanker payudara MCF-7. Hasil uji sitotoksisitas menunjukkan bahwa perlakuan ekstrak etanol daun *A. flava* memberikan pengaruh terhadap morfologi sel MCF-7 pada perlakuan. Pengamatan morfologi sel dilakukan di bawah mikroskop *inverted*. Gambar 1 menunjukkan adanya perbedaan morfologi pada sel kanker payudara MCF-7 setelah perlakuan. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang diberikan maka semakin banyak pula sel yang mengalami kematian. Sel yang hidup tampak berbentuk seperti daun dan menempel pada dasar sumuran, sedangkan sel yang telah mengalami kematian tampak berbentuk bulat dan mengapung pada permukaan sumuran [8].

Uji sitotoksik ekstrak etanol daun *A. flava* terhadap sel kanker payudara memberikan hasil berupa penurunan viabilitas sel (jumlah sel hidup) seiring dengan peningkatan kadar. Semakin tinggi konsentrasi, maka semakin rendah viabilitas sel (Gambar 2). Pada konsentrasi larutan uji 100 µl/ml menunjukkan viabilitas sel sebesar 48,19 %; 200 µl/ml sebesar 48,80 %; 400 µl/ml sebesar 45,56 %; 700 µl/ml sebesar 39,26 %; dan 1000 µl/ml sebesar 18,13 %.



Gambar 1. Morfologi sel MCF-7 di bawah mikroskop *inverted* (perbesaran 500x, inkubasi 24 jam). Sel MCF-7 kontrol (A), perlakuan ekstrak etanol *A. flava* 100 µl/ml (B), 200 µl/ml (C), 400 µl/ml (D), 700 µl/ml (E), 1000 µl/ml (F). Keterangan: sel hidup ( ) dan sel mati ( ).

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

Berdasarkan hasil uji sitotoksisitas, nilai rata-rata  $IC_{50}$  dari tiga eksperimen sebesar  $135,74 \pm 16,82$  µg/ml. Nilai  $IC_{50}$  menunjukkan konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7 sebesar 50% dari populasi. Hal ini dapat diartikan bahwa, dengan konsentrasi ekstrak  $135,74 \pm 16,82$  µg/ml dapat menghambat pertumbuhan sel kanker payudara sebanyak 50% dari total populasi. Berdasarkan nilai  $IC_{50}$ , dapat dikatakan bahwa ekstrak etanol daun *A. flava* berpotensi sebagai senyawa sitotoksik pada sel kanker payudara MCF-7 karena nilai  $IC_{50}$  yang didapatkan tidak lebih dari 500 µg/ml. Suatu ekstrak dianggap memiliki efek sitotoksik apabila nilai  $IC_{50} < 500$  µg/ml [9].

Selain menghasilkan nilai  $IC_{50}$ , pada eksperimen ini juga menghasilkan nilai CV rata-rata dari 3 eksperimen yaitu sebesar 12,39 %. Batasan CV maksimal yang diperbolehkan untuk uji menggunakan sel adalah 30 %. Oleh karena itu, nilai CV dapat diterima karena nilainya kurang dari 30 % [10].

## Pembahasan

Berdasarkan nilai  $IC_{50}$ , dapat dikatakan bahwa ekstrak etanol daun *A. flava* berpotensi sebagai senyawa sitotoksik pada sel kanker payudara MCF-7 karena nilai  $IC_{50}$  yang didapatkan tidak lebih dari 500 µg/ml. Penggunaan pelarut etanol total ekstrak daun *A. flava* diduga mempunyai pengaruh besar terhadap nilai  $IC_{50}$  yang didapatkan. Ekstrak tersebut memiliki beberapa kandungan senyawa, seperti golongan alkaloid protoberberin, flavonoid, saponin, dan triterpena [11]. Dari beberapa senyawa tersebut, senyawa golongan alkaloid protoberberin diduga merupakan senyawa utama yang dapat menghasilkan efek sitotoksik pada sel kanker payudara. Walaupun tidak signifikan, senyawa selain golongan alkaloid protoberberin juga dapat mempengaruhi aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker MCF-7. Di dalam senyawa golongan alkaloid protoberberin terdiri dari berberin, palmatin, dan

jatorrhizin. Beberapa senyawa tersebut memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker MCF-7 dengan aktivitas terbesar dimiliki oleh berberin [5].

Kandungan berberin dalam ekstrak kloroform daun *A. flava* adalah 0,0423% b/b atau setara dengan 0,106 mg berberin dalam 250 mg ekstrak kloroform *A. flava* [12]. Kadar berberin dalam ekstrak etanol terpurifikasi daun *A. flava* adalah 0,14% b/b [13]. Aktivitas sitotoksik ekstrak etanol terpurifikasi daun *A. flava* terhadap sel MCF-7 memiliki IC<sub>50</sub> sebesar 1829,84 ± 288,2 µg/ml, hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun *A. flava* terpurifikasi tidak memiliki potensi yang baik sebagai agen sitotoksik pada sel kanker payudara karena nilai IC<sub>50</sub> yang di dapatkan lebih dari 1.000 µg/ml [14]. Oleh karena itu, dapat diduga bahwa berberin dan senyawa lainnya yang terkandung dalam ekstrak total lebih banyak daripada ekstrak etanol terpurifikasi. Maka dari itu perlu dipastikan dengan adanya penelitian lebih lanjut mengenai total kandungan berberin yang terdapat di dalam ekstrak etanol daun *A. flava*. Menurut Keawpradub *et al.*, [5], ekstrak metanol *A. flava* memiliki kemampuan sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7, kemungkinan dapat disebabkan oleh kandungan berberin yang ada di dalamnya. Selain berberin, di dalam alkaloid protoberberin juga terdapat senyawa palmartin. Senyawa ini berpotensi sebagai antikanker pada kulit tikus albino Swiss [16]. Selain itu kelompok 13-n-alkil palmartin memiliki efek sitotoksik yang kuat pada tikus dengan S180 sarkoma xenograf *in vivo* [17].

Hasil uji sitotoksisitas ekstrak etanol daun *A. flava* diketahui memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7. Namun belum jelas bagaimana mekanisme molekulernya. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai mekanisme molekuler sitotoksisitas ekstrak etanol daun *A. flava* terhadap sel kanker payudara MCF-7.

### **Simpulan dan Saran**

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun *A. flava* memiliki potensi sebagai agen kemoprevensi berdasarkan aktivitas sitotoksiknya terhadap sel kanker payudara MCF-7 dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 135,74 ± 16,82 µg/ml.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, saran yang dapat diberikan antara lain perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai total kandungan berberin yang terdapat di dalam ekstrak etanol *A. flava*. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai mekanisme molekuler sitotoksisitas ekstrak etanol daun *A. flava* terhadap sel kanker

*Artikel Ilmiah Hasil Penelitian Mahasiswa 2015*

payudara MCF-7.

### **Daftar Pustaka**

- [1] IARC (International Agency for Research on Cancer). Latest world cancer statistics, global cancer burden rises to 14.1 million new cases in 2012: marked increase in breast cancers must be addressed. Perancis: WHO. PressRelease. 2013 : 223.
- [2] ACS (American Cancer Society). Breast cancer. URL:<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003090-pdf.pdf>. 2015. [diakses tanggal 29 April 2015].
- [3] Andalusia R. Kegagalan terapi kanker karena resistensi obat dan toksisitas. Berita Prestasi UGM. 2015: 1.
- [4] Mangan Y. Cara Bijak Menaklukkan Kanker. AgroMedia. 2013.
- [5] Keawpradub N, Dej-adisai S, and Yuenyongsawad S. Antioxidant and cytotoxic activities of Thai medicinal plants named khaminkhruea: *Arcangelisia flava*, *Cosciniu blumeanus*, and *Fibraurea tinctoria*. SJST. 2005. 27 (2): 455-467.
- [6] Sinaga E, Suprihatin, and Wiryanti I. 2011. Perbandingan daya sitotoksik ekstrak rimpang 3 jenis tumbuhan Zingiberaceae terhadap sel kanker MCF-7. *Jurnal Farmasi Indonesia*, 5(3): 125-133.
- [7] Doyle A. and Griffiths J. B. Cell and tissue culture for medical research. John Willey and Sons, Ltd., New York. 2000.
- [8] Fitria M, Armandari I, Septhea D B, Ikawati A H M, and Meiyanto E. Ekstrak etanolik herba ciplukan (*Physalis angulata* L.) berefek sitotoksik dan menginduksi apoptosis pada sel kanker payudara MCF-7. *Bionatura – Jurnal Ilmu-ilmu Hayati dan Fisik* ISSN 1411 - 0903 Vol. 13, No. 2, Juli 2011 : 101 – 107.
- [9] Machana S, Weerapreeyakul N, Barusrux S, Nonpunya A, Sripanidkulchai B, and Thhitimetharoch. Cytotoxic and apoptotic effects of six herbal plants against the human hepatocarcinoma (Hepg2) cell line. *TCM*. 2011. 6:39.
- [10] Vanderperren H, Wouweb N V, Behets S, Windal I, Overmeireb I V, and Fontaine A. TEQ-value determinations of animal feed; emphasis on the CALUX bioassay validation. *WIV-ISP*. 2004. 63: 1277–1280.
- [11] Maryani. The phytochemistry and the anti-bacterial activity of yellow root (*Arcangelisia flava* Merr.) against *Aeromonas hydrophila*. *JBSL*. 2013: 4.2.
- [12] Baroroh R. Q. Pengaruh ekstrak kloroform akar

- kuning (*Arcangelisia flava* Merr.) terhadap sistem imun tikus jantan putih galur wistar yang dipejani doxorubicin. 2014. Skripsi Universitas Jember: 33.
- [13] Puspitasari E. and Ulfa E U., Pengembangan ekstrak etanol *Arcangelisia flava* terstandar sebagai agen pendamping kemoterapi doxorubicin untuk pengobatan kanker. Jember: Fakultas Jember Universitas Jember. 2013
- [14] Utami Y. 2015. Uji Sitotoksitas dan Selektivitas Ekstrak Etanol Tepurifikasi *Arcangelisia flava* pada Sel Kanker Payudara MCF-7. Skripsi Universitas Jember: 26.
- [15] Puspitasari E, and Pangaribowo D. A. Potensi *Arcangelisia flava* sebagai agen kemoprevensi kanker. Penelitian Hibah Bersaing. Jember: Fakultas Jember Universitas Jember. 2014.
- [16] Ali H. and Dixit S. Extraction optimization of *Tinospora cordifolia* and assessment of the anticancer activity of its alkaloid palmartine. 2013. The Scientific World Journal. 10: 1-10.
- [17] Zhang L, Li J, Ma F, Yao S, Wang Y, Wang X, and Yao Q. Synthesis and cytotoxicity evaluation of 13-N-Alkyl berberine and palmartine analogues as anticancer agents. NCBI. 2012.17 (10): 11294-302.