

UJI SITOTOKSISITAS FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK ETANOL 70% HERBA CEPLUKAN (*Physalis angulata* Linn.) TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D SECARA *IN VITRO*

IN VITRO CYTOTOXICITY ASSAY ETHYLE ACETATE FRACTION OF ETHANOL EXTRACT 70% CUTLEAF GROUNDCHERRY HERB (*Physalis angulata* Linn.) AGAINST BREAST CANCER CELLS T47D

Dwityanti¹, Kusmardi², Pritta Adrianne Pertamawati¹

¹Fakultas Farmasi dan Sains Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA

²Patologi Anatomi FKUI Jakarta

Naskah diterima tanggal 9 Oktober 2015

ABSTRACT

Cutleaf groundcherry (*Physalis angulata* Linn.) is a natural substance that used as an anticancer. The previous research on cytotoxicity assay of 70% ethanol extract of the cutleaf groundcherry on cells T47D obtained LC_{50} 28,02 $\mu\text{g/ml}$. Accordingly, this research aimed to determine the in-vitro cytotoxic effect of ethyl acetate fraction of cutleaf groundcherry herb against T47D by direct calculation method (viable cell count). Ethyl acetate fraction of 70% ethanol extract of cutleaf groundcherry herb divided by 5-solution concentration are 39,62; 28,02; 19,81; 14,01; 9,90 $\mu\text{g/ml}$. Doxorubicin as positive control was made 8 series of concentrations that 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625; 0,312 and 0,156 $\mu\text{g/ml}$, respectively. From the results of calculation, LC_{50} of Doxorubicin is 0,113 $\mu\text{g/ml}$ and LC_{50} of ethyl acetate fraction of 70% ethanol extract is 7,8608 $\mu\text{g/ml}$. It can be concluded that the ethyl acetate fraction of 70% ethanol extract of cutleaf groundcherry herb has cytotoxic activity against T47D cells and potential candidate as anticancer drug.

Keywords : *Physalis angulata* L, cytotoxicity, T47D cell, breast cancer

ABSTRAK

Herba ceplukan (*Physalis angulata* Linn.) merupakan bahan alam yang digunakan sebagai antikanker. Pada penelitian sebelumnya, ekstrak etanol 70% herba ceplukan memiliki efek sitotoksik terhadap sel T47D dengan nilai LC_{50} 28,02 $\mu\text{g/ml}$. Berdasarkan hal tersebut, dilakukan penelitian ini yang bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksik fraksi etil asetat herba ceplukan terhadap sel T47D secara *in vitro* dengan metode perhitungan langsung (*viable cell count*) sehingga diketahui nilai LC_{50} . Larutan uji fraksi etil asetat ekstrak etanol 70% herba ceplukan dibuat 5 konsentrasi yaitu 39,62; 28,02; 19,81; 14,01; 9,90 $\mu\text{g/ml}$. Doxorubicin sebagai kontrol positif dibuat 8 seri konsentrasi yaitu 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312 dan 0,156 $\mu\text{g/ml}$. Hasil perhitungan diperoleh nilai LC_{50} yaitu 0,113 $\mu\text{g/ml}$ untuk Doxorubicin 17,8608 $\mu\text{g/ml}$ untuk LC_{50} fraksi etil asetat ekstrak etanol 70%. Dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 70% herba ceplukan (*Physalis angulata* Linn.) memiliki sifat sitotoksik terhadap sel T47D dan memiliki potensi sebagai obat antikanker.

Kata kunci: *Physalis angulata* L, sitotoksitas, sel T47D, kanker payudara

PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyakit tidak menular yang disebabkan oleh pertumbuhan sel jaringan tubuh yang tidak normal dan tidak terkendali. Sel kanker bersifat ganas, tumbuh cepat, dan

menyebarkan melalui pembuluh darah dan pembuluh getah bening, sehingga dapat bermetastasis di tempat lain. Gambaran epidemiologi penyakit kanker di dunia menunjukkan terjadi 10 juta kasus baru kanker setiap tahun, 4,7 juta lebih terjadi di negara maju dan hampir 5,5 juta terdapat di negara berkembang (Depkes RI, 2007).

Penyakit kanker payudara merupakan penyebab kematian kedua akibat kanker pada

Alamat korespondensi :

Islamic Center, Jl. Delima II/IV, Perumnas Klender, Jakarta Timur

Email: dwity.farmasi@gmail.com

wanita setelah kanker leher rahim dan merupakan kanker yang paling banyak dijumpai pada wanita. Data yang diperoleh dari *American Cancer Society* menyebutkan bahwa kurang lebih 40.190 kasus kematian kanker payudara terdeteksi pada tahun 2007 dan meningkat sekitar 30% dalam kurun waktu 25 tahun (Rasjidi, 2009).

Upaya pengobatan kanker payudara secara umum kadang menimbulkan efek samping yang tidak diinginkan, maka perlu digunakan alternatif lain dengan senyawa bahan alam yang terdapat dalam tumbuh-tumbuhan yang berkhasiat obat yang memiliki banyak fungsi dan hampir seluruh bagian tanamannya dapat dimanfaatkan.

Salah satu tanaman yang mempunyai potensi sebagai antikanker adalah herba ceplukan (*Physalis angulata* Linn.). Tanaman ini mengandung beberapa senyawa aktif antara lain saponin, flavonoida, polifenol, asam klorogenat, alkaloid, vitamin C, gula, tanin, asam sitrun, dan fisalin (Djajanegara 2010). Pada penelitian sebelumnya, ekstrak etanol 70% herba ceplukan (*Physalis angulata* Linn.) sitotoksik terhadap sel T47D dengan nilai LC_{50} 28,02 $\mu\text{g/ml}$ (Djajanegara 2010). Dengan demikian ekstrak herba ceplukan dikatakan memiliki potensi sebagai antikanker karena jika suatu zat memiliki nilai $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$ zat tersebut dianggap sebagai sitotoksik (Hudgson, 2000).

Fraksi etil asetat ekstrak etanol 70% herba ceplukan (*Physalis angulata* L.) terhadap sel T47D secara *in vitro*. Sel T47D diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara seorang wanita, dan sering dipakai dalam penelitian kanker secara *in vitro* karena mudah penanganannya dan memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas (Burdal *et al.*, 2003). Pengujian uji sitotoksik pada kultur sel dilakukan dengan menggunakan metode perhitungan langsung.

METODOLOGI

Alat Penelitian

Toples kaca, timbangan analitik, gelas ukur, vakum uap (*rotary evaporator*), oven, mesin penggiling, cawan porselen, penangas air, corong pisah, gelas ukur, gelas beker, *blue tip*, *yellow tip*, tabung *conical* steril, *tissue culture flask*, tabung eppendorf, pH meter, timbangan analitik, autoklaf, sentrifuse, inkubator CO_2 , *laminar air flow biological safety cabinet*, mikroskop, pipet mikro, *microplate* 96

sumuran, hemositometer, tangki nitrogen cair, *syringe filter* steril 0,2 μm , kamera digital.

Bahan Penelitian

Herba ceplukan, kultur sel T47D, etanol 70%, etilasetat, n-heksan, dimetil sulfoksida (DMSO), medium kultur *Rosewell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI 1640), *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%, alkohol, fungizon, *Phospat Buffer Salina* (PBS), natrium bikarbonat, dinatrium hidrogen fosfat, natrium klorida (NaCl), biru tripan, akuabides.

Prosedur Penelitian

1. Ekstraksi Herba Ceplukan

Proses ekstraksidilakukan dengan cara maserasi yaitu dengan memasukkan serbuk kering simplisia ke dalam botol bermulut (maserator) kemudian ditambahkan 10 bagian etanol 70%. Serbuk simplisia direndam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk agar zat aktif yang terdapat pada simpisia terlarut, kemudian didiamkan selama 18 jam. Maserat dipisahkan dengan menggunakan kertas saring, ulangi proses penyarian sekurang-kurangnya dua kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama. Maserat yang diperoleh dipekatkan menggunakan vakum *rotary evaporator* dengan suhu rendah $\pm 50^\circ\text{C}$ hingga kental. Kemudian dikeringkan di dalam oven untuk menghilangkan sisa pelarut agar didapatkan ekstrak kental yang bebas etanol (Depkes RI 2008).

2. Fraksinasi Herba Ceplukan

Proses fraksinasi ekstrak etanol 70% dilakukan dengan cara memasukkan ekstrak etanol 70% ke dalam corong pisah. Proses fraksinasi dilakukan secara bertingkat dimulai dengan menggunakan pelarut n-heksan, fraksi n-heksan yang diperoleh dipisahkan. Lapisan etanol selanjutnya difraksinasi kembali menggunakan pelarut etil asetat. Fraksi etil asetat yang diperoleh diuapkan dengan *vacum rotary evaporator* pada suhu 50°C hingga kental. Kemudian fraksi tersebut dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C hingga diperoleh bobot tetap (Depkes RI 1986). Selanjutnya dilakukan perhitungan nilai rendemen ekstrak dan susut pengeringan (Depkes RI, 2000)

Fraksi etil asetat diperiksa secara organoleptis dan dilakukan uji penapisan fitokimia meliputi pemeriksaan alkaloid, saponin, flavonoid, tanin dan triterpenoid. (Depkes RI 2000)

Tabel 1. Hasil Uji Penapisan Fitokimia

No	Penapisan	Jenis	
		Ekstrak	Fraksi etil asetat
1.	Alkaloid	+	+
2.	Saponin	+	+
3.	Flavonoid	+	-
4.	Tanin	+	+
5.	Triterpenoid	-	-

Keterangan :

- + : mengandung senyawa yang dimaksud
- : tidak mengandung senyawa yang dimaksud

3. Pembuatan Larutan Uji Fraksi Etil Asetat dari Ekstrak Herba Ceplukan

Sebanyak 500 mg fraksi etil asetat ekstrak etanol 70% herba ceplukan dilarutkan dalam labu 100 ml sehingga diperoleh konsentrasi larutan induk 5000 µg/ml. Selanjutnya dari larutan induk ini dilakukan pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi larutan uji 39,62; 28,02; 19,81; 14,01; dan 9,90 µg/ml.

4. Pemanenan dan Perhitungan Sel T47D

Setelah jumlah sel cukup, sel T47D dicuci tiga kali dengan 10 ml PBS. Kemudian ditambahkan 3 ml PBS dan 1 ml *trypsin* untuk melepaskan sel dari dinding *flask*. Sel dipindahkan dalam tabung konikal steril, ditambahkan medium hingga 10 ml. Suspensi sel disentrifuse dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit. Pelet yang diperoleh dibuang, supernatan disuspensikan dalam 10 ml media RPMI 1640 dan dihitung jumlahnya menggunakan *haemocytometer* dengan mencampurkan 20 µl suspensi sel dengan 180 µl *tripan blue* di bawah mikroskop. Sebanyak 10 µl campuran dipipet ditaruh pada permukaan kamar hitung dengan menyinggung pinggir kaca penutup. Biarkan kamar hitung terisi larutan perlahan-lahan sampai penuh. Sel diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 100 kali.

5. Uji Sitotoksitas dengan Metode Perhitungan Langsung

Uji sitotoksitas dengan metode perhitungan langsung dilakukan dengan membagi 3 kelompok pengujian, yaitu larutan uji dengan 5 konsentrasi larutan media sebagai kontrol negatif dan pelarut (DMSO) sebagai kontrol pelarut. Selanjutnya sebanyak 100 µl

masing-masing larutan uji yang telah disebutkan di atas dimasukkan kedalam plat 96 sumuran dan ditambahkan suspensi sel sebanyak 100 µl kemudian diinkubasikan selama 24 jam pada 37°C. Pengujian diulang tiga kali (*triplo*) agar diperoleh hasil yang valid. Presentase kematian sel dihitung dengan metode perhitungan langsung menggunakan rumus sebagai berikut (Doyle dan Griffiths, 2000)

$$\% \text{ viabilitas} = \frac{\text{jumlah sel yang hidup}}{\text{jumlah sel hidup+mati}} \times 100\% \dots\dots (1)$$

$$\% \text{ kematian} = 100\% - \% \text{ viabilitas} \dots\dots (2)$$

Persen kematian yang diperoleh dari masing-masing konsentrasi diubah kedalam angka probit dengan menggunakan tabel probit, dari data tersebut dibuat persamaan regresi linier untuk melihat hubungan antar perlakuan dengan persen kematian sel.

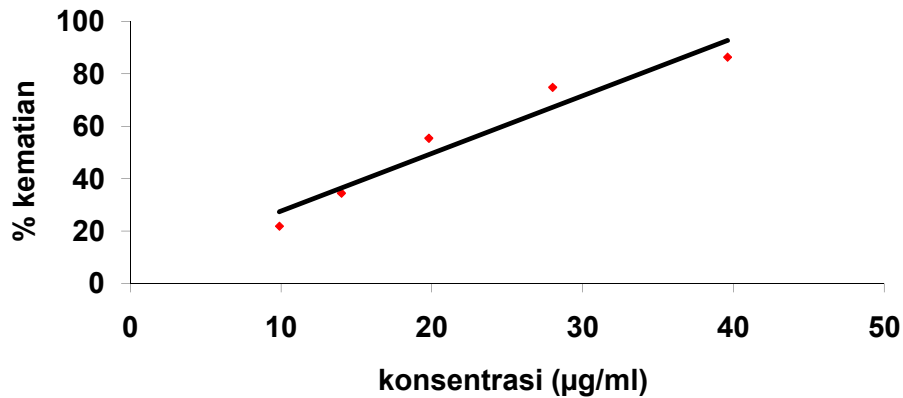
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil determinasi tanaman di Herbarium Bogoriense dapat diperoleh kepastian bahwa tanaman yang digunakan sebagai bahan utama dalam penelitian ini adalah tanaman herba ceplukan (*Physalis angulata* Linn.) dari suku *solanaceae*. Hasil maserasi herba ceplukan diperoleh ekstrak kental sebanyak 410,2 g, dan fraksi etil asetat herba ceplukan sebanyak 39,4398 g. Hasil perhitungan susut pengeringan dan rendemen ekstrak dan fraksi diperoleh susut pengeringan 6,11% dan rendemen ekstrak 21,59%. Sedangkan hasil susut pengeringan dan rendemen fraksi 5,09% dan 2,07%.

Pemeriksaan organoleptis menunjukkan ekstrak berwarna coklat dan berbau khas. Hasil Uji penapisan fitokimia terhadap ekstrak dan fraksi dapat dilihat pada Tabel 1

Tabel 2. Persentase Kematian Sel T47D Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol 70% Herba Ceplukan

Konsentrasi (µg/ml)	Log konsentrasi (X)	% Kematian	Probit (Y)
39,62	1,5979	86,3	6,0939
28,02	1,4475	74,8	5,6682
19,81	1,2969	55,4	5,1313
14,01	1,1464	34,5	4,6011
9,90	0,9956	21,9	4,2244



Gambar 1. Hubungan Konsentrasi (µg/ml) dengan Persentase Kematian

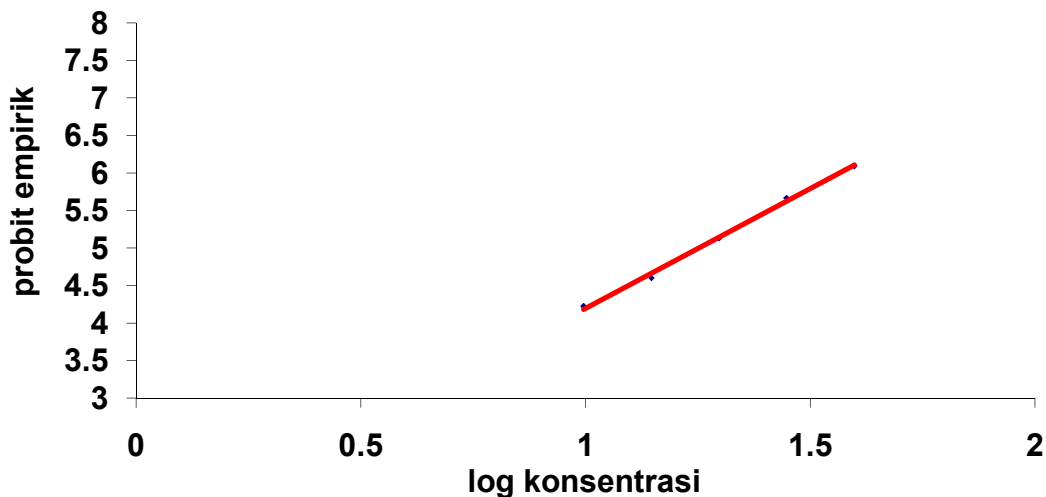
Hasil uji sitotoksitas menunjukkan persentase kematian tertinggi terdapat pada larutan uji fraksi etil asetat ekstrak etanol 70% herba ceplukan konsentrasi 39,62 µg/ml sebesar 86,3%. Berdasarkan perhitungan persamaan regresi linier diperoleh nilai LC_{50} 17,8608 µg/ml. Hasil persentase kematian sel fraksi etil asetat ekstrak etanol 70% herba ceplukan terhadap sel T47D dari masing-masing konsentrasi dapat dilihat pada Tabel 2.

Uji sitotoksitas dilakukan secara *in vitro*. Metode ini dipilih karena metodenya cepat, hanya memerlukan sedikit senyawa yang digunakan dalam pengujian, tidak memerlukan hewan uji dan dapat memberikan informasi tentang potensi efeknya pada sel target secara langsung. Pengujian fraksi etil asetat ekstrak etanol 70% herba ceplukan bertujuan untuk mengetahui aktivitas fraksi herba ceplukan (*Physalis angulata* Linn.) sebagai senyawa sitotoksik.

Penetapan jumlah sel yang bertahan hidup pada uji sitotoksitas ini dilakukan berdasarkan parameter kerusakan membran

yang dilakukan menggunakan pewarna *tripan blue*. Jika sel kanker payudara T47D mati maka akan terjadi kerusakan membran, sehingga protein di dalam sel akan keluar dan akan berikatan dengan *tripan blue* sehingga sel mati akan tampak biru. Sedangkan sel yang hidup karena membran plasmanya masih utuh maka protein dalam sel tidak akan berikatan dengan pewarna *tripan blue* sehingga sel tampak terang bersinar.

Hasil penelitian yang dilakukan terhadap sel kanker payudara T47D menggunakan fraksi etil asetat ekstrak etanol 70% herba ceplukan inkubasi 24 jam diperoleh nilai LC_{50} 17,8608 µg/ml. Nilai LC_{50} yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat ekstrak etanol 70% herba ceplukan memiliki sifat sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dan memiliki potensi sebagai obat antikanker. Untuk memisahkan zat yang bersifat sitotoksik tersebut, maka dilakukan isolasi lebih lanjut, sehingga herba ceplukan dapat dimanfaatkan untuk pengembangan obat tradisional pada penyakit kanker khususnya kanker payudara.



Gambar 2. Hubungan Log Konsentrasi dengan Probit (Probit Empirik) Fraksi Etil Asetat Inkubasi 24 Jam

Grafik hubungan konsentrasi dengan persen kematian sel pada inkubasi 24 jam (grafik 1) dan juga grafik hubungan log konsentrasi dengan probit empirik inkubasi 24 jam (grafik 2) yang membentuk garis linier.

KESIMPULAN

Nilai LC₅₀ fraksi etil asetat ekstrak etanol 70% herba ceplukan (*Physalis angulata* Linn.) pada sel kanker payudara T47D adalah 17,8608 µg/ml dan berpotensi sebagai antikanker.

DAFTAR PUSTAKA

- Burdall ES, Hanby MA, Landsdown RJM dan Speirs V. 2003. *Breast Cancer Cell Line*, *Breast Cancer Res.*, 5(2): 89-95.
- Departemen Kesehatan RI. 1986. *Sediaan Galenik*. Jakarta: Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan; Hlm. 10-12
- Departemen Kesehatan RI. 1989. *Materia Medika Indonesia*. Jilid V. Jakarta: Departemen Kesehatan RI; Hlm. 539-540
- Departemen Kesehatan RI. 2000. *Buku Panduan Teknologi Ekstrak*. Jakarta: Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan; Hlm. 3, 6, 17, 39
- Departemen Kesehatan RI. 2007. *Pedoman Surveilans Epidemiologi Penyakit Kanker*. Direktorat Pengendalian Penyakit Tidak Menular. Ditjen PP & PL, Jakarta.
- Departemen Kesehatan RI. 2008. *Farmakope Herbal Indonesia Edisi 1*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI; Hlm. 174-175.
- Djajanegara I. 2010. *Uji Sitotoksitas Ekstrak Etanol Physalis angulata Linn. Terhadap Sel T47D Secara In Vitro*. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 8 (1): 41-7.
- Doyle A, Griffiths JB. 2000. *Cell and Tissue Culture For Medical Research*. John Wiley & Sons, New York.
- Hudgson EP. 2000. *Textbook of Modern Toxicology 2nd ed*. The McGraw-hill Companies, Inc, Singapore.
- Rasjidi I. 2009. *Deteksi Dini dan Pencegahan Kanker Pada Wanita*. Sagung seto, Jakarta