

Sitotoksitas Ekstrak Kayu Beta-Beta (*Lunasia amara*) pada Sel Kanker Payudara T47D

Hasnaeni^{1,*}, A. Emelda²

¹ Laboratorium Farmakognosi-Fitokimia, Fakultas Farmasi, Universitas Muslim Indonesia

² Laboratorium Farmakologi, Fakultas Farmasi, Universitas Muslim Indonesia

*Email: hasnaeni.hasnaeni@umi.ac.id

Abstract

Cancer is a major health problem in the world, both in developed and developing countries. Cancer is a cause of high mortality and economic problems. Various attempts have been made to deal with cancer, but the morbidity and mortality rate is still high. The use of synthetic drugs and chemotherapy is often not selective. Anti-cancer ingredients not only attack cancer cells but also normal cells, causing serious side effects (Sausville and Longo, 2005). This has led to finding more selective and sensitive anti-cancer drugs. One strategy undertaken to overcome this situation is the exploration of plants that have the potential to be anti-cancer. Wood beta-beta (*Lunasia amara*) has the potential to be anti-cancer because it contains active compounds and a high antioxidant effect. Active oxygen and free radicals are associated with several physiological and pathological cases such as cancer, inflammation, immunity, aging, mutagenic and carcinogenic. The extraction method used is the maceration and drying extract method with a rotary evaporator. In the research, a cytotoxicity study of beta-beta wood extract using T47D breast cancer cells will be carried out to develop the use of this plant as a candidate for a new drug for cancer. Ethanol extract as a test sample is directed for continuous testing of beta-beta wood plants.

Keywords: Wood beta-beta (*Lunasia amara* Blanco.), Cytotoxicity, T47D breast cancer cells

Abstrak

Penyakit kanker merupakan masalah kesehatan yang utama di dunia, baik di negara maju maupun di negara berkembang. Kanker menjadi penyebab kematian yang tinggi dan masalah ekonomi. Berbagai upaya telah dilakukan untuk penanganan kanker, namun angka kesakitan dan kematian masih tetap tinggi. Penggunaan obat sintetik dan kemoterapi sering tidak selektif. Bahan anti kanker tidak hanya menyerang sel kanker tetapi juga sel normal sehingga menimbulkan efek samping yang serius [20]. Hal ini mendorong untuk menemukan obat anti kanker yang lebih selektif dan sensitif. Salah satu strategi yang dilakukan untuk mengatasi keadaan tersebut adalah dengan eksplorasi terhadap tanaman yang berpotensi sebagai anti kanker. Kayu beta-beta (*Lunasia amara*) berpotensi sebagai anti kanker karena mengandung senyawa aktif dan efek antioksidan yang tinggi. Oksigen aktif dan radikal bebas berhubungan dengan beberapa kasus secara fisiologi dan patologis seperti kanker, peradangan, kekebalan, penuaan, mutagenik dan karsinogenik. Metode ekstraksi yang digunakan yaitu metode maserasi dan pengeringan ekstrak dengan *rotary evaporator*. Pada penelitian akan

di lakukan kajian sitotoksitas dari ekstrak kayu beta-beta dengan menggunakan sel kanker payudara T47D, untuk pengembangan penggunaan tanaman ini sebagai kandidat obat baru untuk kanker. Ekstrak etanol sebagai sampel uji diarahkan untuk pengujian yang berkelanjutan dari tanaman kayu beta-beta.

Kata Kunci: Kayu beta-beta (*Lunasia amara* Blanco.), sitotoksitas, sel kanker payudara T47D.

Submitted: 15 April 2019

Accepted: 01 Oktober 2019

DOI: <https://doi.org/10.25026/jsk.v2i3.128>

■ Pendahuluan

Tanaman yang berpotensi sebagai antikanker sangat banyak namun belum di eksplorasi. Salah satu diantaranya adalah kayu beta-beta (*Lunasia amara*). Telah diketahui adanya aktivitas antioksidan dari ekstrak kayu beta-beta (*Lunasia amara*) dan adanya kandungan senyawa seperti steroid, fenolik, saponin, alkaloid dan kumarin. Kayu beta-beta umumnya tumbuh diantara bebatuan besar dan memiliki sebaran spesial yang cenderung berkelompok pada tempat di sekitar bebatuan. Kayu beta-beta pada penelitian ini diambil pada hutan lindung di Desa Siawung Kabupaten Barru Sulawesi selatan. Desa Siawung mempunyai tanah lempengan kedalaman 25 meter dengan pH 5,0-6,5 dengan ketinggian 0-800 meter di atas permukaan laut (dpl). Suhu udara rata-rata pada siang hari dan malam hari sekitar 20-30°C, kelembaban udara antara 55-70°C [1]. Tumbuhan ini dapat ditemukan di berbagai daerah di Pulau Sulawesi hingga Pulau Papua bagian barat. Nama daerah tumbuhan ini berbeda-beda di setiap daerah, di Desa Siawung Kabupaten Barru Sulawesi Selatan dikenal sebagai kayu beta-beta, di Desa Sanrego Kabupaten Bone Sulawesi Selatan dikenal sebagai kayu sanrego, di Minahasa, tumbuhan ini dikenal dengan sebutan pintan, makelum halaluna atau aifata, dan di Madura dikenal dengan sebutan pamaitan [2]. Kandungan senyawa bioaktif antara lain golongan alkaloid, yakni lunakridina, lunakrina, lunasina dan lunania; kalsium oksalat, asam formiat, steroid dan glukosida [2-5].

Tahap pengembangan obat anti kanker meliputi identifikasi *lead*, optimasi *lead* dan pengembangan *lead*. Uji toksikologi untuk menentukan keamanan dosis awal pada manusia merupakan salah satu bagian dari tahap pengembangan *lead*. Pengujian toksisitas secara *in vitro* telah digunakan secara luas untuk skrining

awal tumbuhan karena (a) sederhana; (b) waktu yang dibutuhkan relatif lebih singkat, (c) hanya memerlukan sedikit bahan uji; (d) murah; (e) lebih sensitif; (f) reliabel; (g) dapat mengurangi jumlah hewan coba secara drastis; (h) dapat diulangi; (i) dapat menghasilkan data yang menunjukkan mekanisme dan interaksi target [6-8]. Secara umum, uji *in vitro* dikelompokkan menjadi dua golongan utama yaitu uji seluler (*cell-based assay* atau *cytotoxicity-based bioassay*) dan uji molekuler (*mechanism-based assay*). Uji seluler menggunakan sel utuh sedangkan uji molekuler menggunakan sistem teriosalsi misalnya enzim, reseptor, DNA dan lain-lain [8]. Uji seluler biasanya digunakan untuk skrining awal pada uji sitotoksik ekstrak, sedangkan uji molekuler bertujuan untuk melihat penghambatan spesifik pada ekspresi onkogen atau onkoproduk atau penghambatan spesifik target biokimia pada tingkat sub seluler seperti enzim dan reseptor [8].

Dalam penelitian ini akan dilakukan kajian sitotoksitas ekstrak kayu beta-beta terhadap sel kanker payudara T47D, untuk lebih menambah data ilmiah dari kayu beta-beta. Sehingga penggunaan kayu beta-beta sebagai bahan baku obat lebih dapat dipertanggungjawabkan.

■ Metode Penelitian

Bahan yang digunakan untuk uji sitotoksitas adalah ekstrak kayu beta-beta (*Lunasia amara*) yang diambil dari daerah Siawung, Kabupaten Barru, Sulawesi Selatan. Kultur sel T47D, *Fetal Bovine Serum* (FBS) (Gibco, Invitrogen, USA), tripsin EDTA 0,25% (Gibco, Invitrogen, Canada), MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida] (Sigma-Aldrich, USA), *Phosfat buffer saline* (PBS), perekasi stopper yang mengnadung 10% (w/v) natrium dodesil sulfat

(Merck-Schuchardt, Germany) dalam 0,1 N HCl (Merck, Darmstadt, Germany).

Alat penyarian adalah alat bejana maserasi, batu didih, corong pisah, rotavapor, alat gelas, timbangan milligram, timbangan analitik, *beaker glass*, pipet volume, pipet ukur.

Tahapan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen laboratorium dengan rancangan *posttest with control group* yang dilakukan dengan tahapan sebagai berikut : 1) Pengambilan dan pengolahan bahan tumbuhan; 2) Ekstraksi tumbuhan; 3) Uji sitotoksitas dengan sel kanker payudara T47D ; 4) Analisis data.

Pengambilan dan pengolahan bahan tumbuhan

Tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kayu beta-beta (*Lunasia amara*). Lokasi pengambilan bahan tumbuhan yaitu desa Siawung kabupaten Barru Sulawesi Selatan. Setelah bahan dikumpulkan, kemudian dibersihkan dan dikeringkan dengan pada udara terbuka sampai diperoleh bahan dengan kadar air $\pm 10\%$. Setelah kering sampel dibuat serbuk dengan ukuran 60 mesh.

Ekstraksi dan fraksinasi tumbuhan

Serbuk kayu beta-beta ukuran 60 mesh sebanyak 2000 gram diekstraksi secara maserasi pada suhu kamar dengan etanol 70% selama 72 jam. Proses maserasi di ulang 3 kali dengan pelarut yang sama. Ekstrak etanol dikumpulkan dan diuapkan dengan rotary evaporator vakum sehingga diperoleh ekstrak etanol kental. Ekstrak kental etanol kemudian dikeringkan dengan cawan porselin di atas penegas air dan ditimbang sehingga dapat diperoleh rendemen ekstrak. Ekstrak etanolik yang diperoleh disuspensi dengan 100 ml air dan dipartisi dengan 100 ml n-heksana dan diklorometan (DCM) sebanyak tiga kali menggunakan corong pisah. Lapisan n-hexana dan DCM dipisahkan dan dipisahkan diperoleh fraksi n-hexana dan fraksi DCM. Ekstrak yang diperoleh akan di uji aktivitas sitotoksiknya pada sel kanker T47D.

Uji sitotoksisitas dengan sel kanker payudara T47D

a. Pembuatan media kultur

Media kultur yang digunakan adalah RPMI 1640 untuk menumbuhkan sel T47D. Serbuk RPMI 1640 dilarutkan dalam 800 ml akuabidestilata kemudian ditambahkan 2 gram HEPES pada media RPMI. Larutan dibuat pada pH 7,2-7,4 dengan cara menambahkan larutan HCl 1N, kemudian volume larutan di cukupkan sampai 1000 ml. Larutan disterilkan dengan cara menyaring larutan menggunakan filter membran nitroselulosa 0,22 μm dan di simpan pada suhu 4°C.

b. Pembuatan larutan PBS pH 7,4

Sebanyak 8 g serbuk NaCl di larutkan dalam 800 ml akuabidestillata kemudian di tambahkan 0,2 g KH_2PO_4 , 115 g Na_2HPO_4 dan 0,2 KCl. Larutan di aduk dan diatur pHnya sampai pH7,4 dengan menambahkan HCl 1N. Volume larutan PBS dicukupkan sampai 1000 ml. Larutan di strilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 30 menit.

c. Pembuatan larutan MTT 5 mg/ml

Sebanyak 50 mg MTT dilarutkan dalam 10 ml PBS sehingga terbentuk larutan dengan konsentrasi 5 mg/ml.

d. Pembuatan larutan sopper SDS 10%

Sebanyak 10 g Sodium dodexyl sulfate di arutkan dalam 100 ml HCl 0,01 N sehingga terbentuk larutan SDS 10% dalam HCl 0,01 N.

Penyiapan sampel uji

Sampel uji berupa ekstrak ditambah dengan sebanyak 100 μL dimetil sulfoxida (DMSO) sehingga diperoleh larutan stok sampel uji dengan konsentrasi 50 mg/ml. Konsentrasi akhir sampel uji dibuat dengan mengencerkan secara serial larutan stok menggunakan media kultur.

Penyiapan kultur sel

Sel T47D diperoleh dari laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Sel ditambahkan pada *tissu culture flask* . Sel T47D ditumbuhkan dengan media

RPMI 1640. Semua media disuplementasikan dengan 10% PBS, 2% penisilin-streptomisin dan 0,5% fungison. Sel dalam tissue culture flask diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, CO₂ 5%. Perkembangbiakan sel diamati setiap hari dibawah mikroskop dan sel yang telah konfluen (80-90%) dipanen.

Pemanenan sel

Panen sel dilakukan dengan tripsinasi sel selama 3 menit. Jumlah masing-masing sel setelah pemanenan dihitung menggunakan *haemocytometer* di bawah mikroskop.

Uji sitotoksitas

Uji sitotoksitas ekstrak etanol terhadap sel kanker payudara T47D dilakukan dengan metode MTT (3,4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrasolin bromida). Sebanyak 100 µl suspensi sel dengan kepadatan 1×10⁴ sel/sumuran dimasukkan ke dalam sumuran mikroplat 96. Sel diinkubasi pada inkubator CO₂ 5% dengan suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam media sel dibuang kemudian diganti dengan media baru yang berisi larutan sampel dengan berbagai seri konsentrasi. Sebagai pembanding digunakan obat standar doksorubisin. Setelah diinkubasi 24 jam, sel dicuci kemudian ditambahkan 100µl media baru dan 10 µl larutan MTT (5 mg/ml). Sel diinkubasi selama 4 jam kemudian ditambahkan 100µl larutan stopper SDS 10% dala larutan HCl 0,01 N untuk melarutkan formazan. Sel dibiarkan semalam pada suhu kamar

dalam ruang gelas. Absorbansi sel diukur dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 595 nm.

Viabilitas sel dihitung dengan rumus:

$$\%sel\ hidup = \frac{Absorbansi\ Perlakuan - Absorbansi\ Media}{Absorbansi\ Kontrol - Absorbansi\ Media} \times 100\%$$

Nilai IC₅₀ dihitung dengan menggunakan analisis regresi linear berdasarkan nilai persentase sel hidup (viabilitas sel)

■ Hasil dan Pembahasan

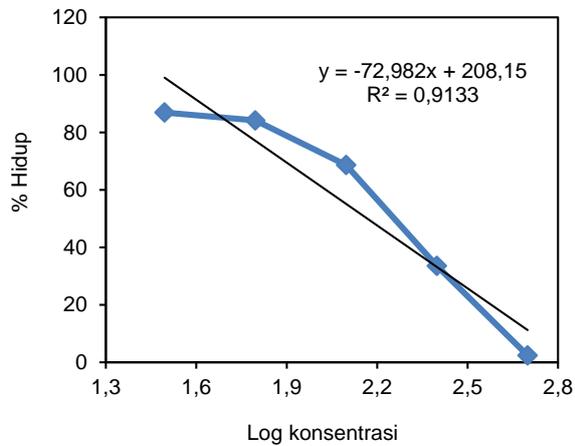
Pada Penelitian ini sampel yang digunakan adalah kayu beta-beta (*Lunasia amara*) sebesar 2000 gram. Kayu beta-beta diekstraksi menggunakan metode maserasi. Ekstraksi secara maserasi yaitu dengan cara merendam sampel dengan pelarut etanol 96%. Penggunaan metode maserasi lebih dipilih karena metode ini lebih sederhana dan tidak banyak gangguan fisis [9]. Pemilihan etanol 96% sebagai pelarut untuk maserasi karena etanol 96% merupakan salah satu pilihan utama untuk mengekstraksi metabolit sekunder yang belum diketahui strukturnya dan digunakan untuk tujuan skrining. Ekstrak etanol yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan rotavapor dan selanjutnya diliofilisasi untuk mendapatkan ekstrak kering, dan diperoleh ekstrak etanol kayu beta-beta sebesar 30,8 gram. Sehingga diperoleh rendemen ekstrak kayu beta-beta sebesar 1,54 %.

Tabel 1. Persentase sel T47D yang hidup dan mati setelah perlakuan dengan ekstrak etanol kayu beta-beta.

Konsentrasi	Log	Pengukuran Absorbansi			C (Rerata Absorbansi Perlakuan)	c-b	a-b	% Hidup	% Mati
		1	2	3					
500	2,70	0,099	0,111	0,109	0,106333	-0,708	-0,814	86,94	13,06
250	2,40	0,361	0,356	0,368	0,3616666	-0,452	-0,814	55,57	44,43
125	2,10	0,627	0,735	0,585	0,649	-0,165	-0,814	20,27	79,73
62,5	1,80	0,814	0,827	0,688	0,7763333	-0,038	-0,814	4,63	95,37
31,5	1,50	0,85	0,846	0,7	0,7986666	-0,015	-0,814	1,88	98,12

Tabel 2 . Nilai absorbansi (a) control dan (b) media

Absorbansi Kontrol (a)	Absorbansi Media (b)
0,934	0,079
0,879	0,09
0,905	0,092
0,906	0,087



Gambar 1. Log Konsentrasi vs % Hidup dari ekstrak kayu beta-beta

Ekstrak kering yang diperoleh dibuat beberapa konsentrasi untuk pengujian sitotoksitas. Pengujian sitotoksitas pada penelitian ini menggunakan sell kanker payudara T47D. Pengukuran sitotoksitas ekstrak etanol kayu beta-beta memberikan nilai IC₅₀ di bawah 4 ug/ml pada sel kanker uji yaitu 2,4 ug/ml pada sel T47D. Hal ini sesuai dengan kriteria aktivitas sitotoksik yang ditetapkan oleh NCI bahwa suatu ekstrak kasar dianggap memiliki aktivitaas sitotoksik *in vitro* bila IC₅₀ pada sel kanker setelah inkubasi 48 jam dan 72 jam adalah kurang daari 20 µg/ml. Sedangkan untuk senyawa murni dianggap aktif bila nilai IC₅₀ kurang dari 4 µg/ml [10]. Berdasarkan nilai IC₅₀, aktivitas sitotoksik suatu bahan uji ke dalam tiga kategori yaitu, sangat aktif bila nilai IC₅₀ kurang dari 5,0 µg/ml, aktivitas sedang bila nilai IC₅₀ adalah 5,0-10 µg/ml dan aktivitas lemah bila nilai IC₅₀ adalah 10-25 µg/ml. Hasil penelitian sitotoksitas ekstrak kayu beta-beta menunjukkan bahwa ekstrak kayu beta-beta termasuk kategori sangat aktif karena memiliki IC₅₀ kurang dari 5 ug/ml. Berdasarkan hasil penelitian ini dan pendekatan kemotaksonomi dan uji pendahuluan, maka kayu beta-beta termasuk famili Rutaceae berpotensi sebagai penghasil senyawa kumarin yang berpotensi sebagai sumber senyawa antikanker.

■ Kesimpulan

Hasil penelitian terhadap uji toksisitas ekstrak kayu beta-beta (*Lunasia amara*) menunjukkan bahwa ekstrak kayu beta-beta mempunyai potensi sebagai

senyawa sitotoksik pada sel kanker payudara T47D atau berpotensi sebagai senyawa antikanker pada sel kanker payudara.

■ Ucapan Terima Kasih

Kepada Lembaga Penelitian dan Pengembangan Sumber Daya (LP2S) Universitas Muslim Indonesia dengan Hibah Penelitian Internal Dosen UMI tahun 2017.

■ Daftar Pustaka

- [1] Profil Desa Siawung Kabupaten Barru, 2013 Dinas Pertanian dan Tanaman Pangan kabupaten Barru.
- [2] Katno, K., dan Haryanti, S., 2009. Efek afrodisiaka ekstrak kayu sanrego (*Lunasia amara Blanco*) terhadap tikus putih jantan. *J. Tumbuh. Obat Indones.*, **2(1 Agt)**.
- [3] Goodwin, S., dan Horning, E. C., 1959. Alkaloids of *Lunasia amara blanco*. Structure of lunacrine. *J. Am. Chem. Soc.*, **81(8)**, 1908–1912.
- [4] Hegnauer, R., 1969, *Chemotaxonomi der Pflanzen*, edisi V. Birkkhauser Verlag. Basel and Stuttgart.
- [5] Sulaiman, Z. M., Lallo, S., dan Djide, N., 2011. In Vitro and In Silico Studies of Lunacridine from *Lunasia Amara Blanco* as Anticancer. *J. Life Sci.*, **5**, 639–645.
- [6] Damia, G., D’Incalei., 2009. Contemporary pre-clinical development of anticancer agent-what are the optimal preclinical models? *Eur. J. Cancer*, **45**:2768:81.
- [7] Doyle, A., Griffiths, J.B., 2000. *Cell and Tissue Culture for Medical Research*. John Wiley and Sons, Ltd, New York.
- [8] Itharat, A., Ooraikul, B., 2007. Reaearch on Thai medicinal plants for cancer treatment, *Advances Med. Plant Res.*, **13**:287-317.
- [9] Choudhary, M. I., Azizuddin, Khalid, A., Sultani, S. Z., dan Atta-ur-Rahman., 2002. A new coumarin from *Murraya paniculata*. *Planta Med.*, **68(1)**, 81–83.
- [10] Tan, G., Gyllenhaal, C., Soejarto, D.D., 2006. Biodiversity as a source of anticancer drugs. *Curr. Drug Targets*, **7**:265:77.