

UJI SITOTOKSISITAS EKSTRAK METANOL UMBI BIT (*Beta vulgaris* L. var. *rubra* L.) TERHADAP *CELL LINE* T47D

Elya Zulfa¹⁾, Sri Susilowati¹⁾, Agnes Budiarti¹⁾

¹⁾ Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang

INTISARI

Kegagalan terapi kanker payudara akibat resistensi sel telah mendorong usaha pengembangan obat anti kanker termasuk dari bahan alam. Beberapa penelitian menyimpulkan tentang adanya aktivitas antioksidan dan antikanker dari umbi bit (*Beta vulgaris* L. var. *rubra* L.) terkait dengan kandungan betasianin dan betasantin yang merupakan golongan senyawa flavonoid. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksik ekstrak metanol umbi bit (*Beta vulgaris* L. var. *rubra* L.) pada *cell line* T47D yang merupakan salah satu jenis sel kanker payudara.

Penelitian dilakukan dalam beberapa tahap uji, yaitu determinasi tanaman, pembuatan ekstraksi metanol, preparasi sel, panen sel, dan uji sitotoksitas. Ekstraksi umbi bit dilakukan dengan metode maserasi menggunakan metanol 70%. Uji sitotoksitas pada *cell line* T47D dilakukan dengan MTT assay menggunakan lima peringkat kadar yaitu 500, 250, 125, 62,5, dan 31,25 µg/ml. Analisis data menggunakan analisis probit.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanol umbi bit tidak memiliki aktivitas sitotoksik terhadap *cell line* T47D. Hal ini ditunjukkan bahwa pada 5 seri konsentrasi ekstrak metanol umbi bit yang diujikan memiliki % kehidupan sel lebih dari 100%.

Kata kunci: Umbi bit, *Beta vulgaris* L. var. *rubra* L., *Cell line* T47D, Sitotoksitas, Flavonoid.

ABSTRACT

Therapy failure of breast cancer as a consequence of cell resistance has encouraged the effort to develop a cancer medicine including herbal medicine. Based on some research, it can be concluded that there is antioxidant and anticancer activity from beetroot involved with betasianin and betasantin substance that belong to flavonoid compound. The purpose of this research was to find the effect cytotoxic of methanolic extract of beetroot (*Beta vulgaris* L. var. *rubra* L.) on *cell line* T47D which was a breast cancer cell.

This research was conducted on several experiment steps namely plant determination, cell preparation, cell harvest, methanolic extraction, and cytotoxic test. The extraction of beetroot is conducted by maceration method using methanol 70%. Cytotoxic test on *cell line* T47D is conducted by MTT assay using five concentration series were 500, 250, 125, 62,5 and 31,25 µg/ml. Data analysis uses probit analysis.

Research result shows that methanolic extract of beetroot there was no cytotoxic activity on *cell line* T47D. It shows that five concentration series methanolic extraction of beetroot have % cell viability more than 100%.

Keyword: Beetroot, *Beta vulgaris* L. var. *rubra* L., *Cell line* T47D, Cytotoxic, Flavonoid.

PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan salah satu kanker yang menyerang wanita Indonesia. Meningkatnya angka kejadian kanker di Indonesia sesuai dengan laporan *World Health Organization* (WHO) yang memperlihatkan bahwa kanker payudara telah ada tidak selalu berhasil dan cenderung menimbulkan efek samping toksik pada

masih menduduki peringkat kedua setelah kanker leher rahim dan menyebabkan ± 502.000 kematian per tahun (Riyasa, 2001).

Pembedahan, kemoterapi, radioterapi, terapi dengan hormon atau dengan terapi antibodi monoklonal merupakan cara pengobatan kanker yang telah dilakukan (Dolinsky, 2002). Namun pengobatan yang jaringan normal serta resistensi sel kanker (Tyagi *et al.*, 2004). Eksplorasi tanaman

obat merupakan usaha pengembangan alternatif pengobatan kanker untuk menghindari efek samping dari berbagai cara pengobatan yang telah ada.

Beberapa penelitian menyimpulkan tentang adanya aktivitas antioksidan dan antikanker dari umbi bit terkait dengan kandungan betasianin dan betasantin yang merupakan pigmen utama dari umbi bit (*Beta vulgaris* L. var. *rubra* L.) (Winkler *et al.*, 2005). Kapadia *et al.* (1996) menyebutkan bahwa *Beta vulgaris* var. *rubra* memiliki efek penghambatan secara signifikan pada teradinya kanker kulit dan kanker paru-paru. Penelitian tentang aktivitas antikanker umbi bit belum pernah dilakukan pada kanker payudara. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian tentang uji sitotoksitas ekstrak metanol umbi bit terhadap *cell line* T47D yang merupakan salah satu jenis sel kanker payudara.

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan

Umbi bit (daerah Jurug Rt 07/ Rw 01, Kelurahan Wates, Kecamatan Getasan, Kabupaten Semarang), metanol 70 % (berderajat teknis), *Cell line* T47D (*Chemoprevention Research Center* UGM), medium RPMI 1640, medium penumbuh mengandung *growth factor* 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*) (GIBCO) – 0,5% fungison – 2% antibiotik penisilin dan streptomisin (GIPCO), DMSO (E.Merck), tripsin (Sigma), *Phospat Buffered Saline* (PBS) (Sigma), larutan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida) 5 mg/mL PBS, larutan *sodium dodecyl sulphat* (SDS) 10% dalam HCl 0,01 N, doksorubisin.

Alat

Pembuatan senyawa uji : blender (Maspion), ayakan mesh 40, alat-alat gelas, timbangan elektrik (Ohaus), botol warna gelap, *thermostatic waterbath* (Memmert), viskosimeter (Rion VT-04E). kultur sel : tangki nitrogen cair, mikropipet (Gilson), *conical tube* (Nunclon), *tissue culture flask* (nunclon), *Laminar Air Flow Cabinet* (Gelman Sciences), stiker label, sentrifugator (Sarvall MC12V), mikroskop fase kontras (Zeiss MC 80), CO₂ *Incubator* (Heraeus). Pemanenan sel: pipet pasteur

steril, mikropipet 1 ml dan 200 µl (Gilson), *white tip* steril, *conical tube* (Nunclon), mikroskop fase kontras (Zeiss MC 80), *haemocytometer* (Neubauer), *counter*, kamera digital (Canon Power Shoot A80,4,0 mega pixels). Uji sitotoksitas : mikropipet 1 ml dan 200 µl (Gilson), tabung reaksi kecil, rak tabung reaksi kecil, timbangan elektrik (Sartorius), *96-well plate* (Nunclon), *conical tube* (Nunclon), *yellow tip* dan *blue tip*, ELISA reader (SLT 240 ATC).

Jalannya Penelitian

a. Pembuatan Ekstrak Metanolik

Maserasi dilakukan dengan cara serbuk kering umbi bit sebanyak 546,7163 gram direndam dengan pelarut metanol sebanyak 5,5 liter. Proses maserasi dilakukan dalam dua tahap, yaitu tahap pertama dengan menggunakan metanol sebanyak 4 liter, kemudian ditutup dan terlindung dari cahaya sambil berulang-ulang diaduk. Setelah 3 hari campuran tersebut diserkai, diperas, dipisahkan filtrat dengan ampasnya. dan pada tahap kedua yaitu remaserasi dengan menggunakan metanol sebanyak 1,5 liter kemudian ditutup dan terlindung dari cahaya sambil berulang-ulang diaduk. Setelah 3 hari campuran tersebut diserkai, diperas, dipisahkan filtrat dengan ampasnya. Filtrat (1) dan (2) dicampur.

Filtrat yang diperoleh dipekatkan pada *thermostatic waterbath* diperoleh ekstrak kental umbi bit sebanyak 25,6450 gram sehingga rendemen ekstraksi pada penelitian ini sebesar 4,69 %. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian diukur kekentalannya menggunakan viskosimeter dengan hasil pengukuran sebesar 90 dPas atau 90 cPas.

b. Pembuatan Larutan Uji

Larutan uji dibuat dari ekstrak metanol umbi bit. Larutan uji tersebut kemudian diencerkan menjadi 5 seri larutan konsentrasi dengan menggunakan pelarut dimetil sulfoksida (DMSO). Angka kelipatan seri konsentrasi diperoleh menggunakan rumus :

$$f = \sqrt[n-1]{\frac{Dt}{Dr}}$$

keterangan :

f = Angka kelipatan seri konsentrasi

n = Banyaknya seri konsentrasi

Dt = Konsentrasi tertinggi

Dr = Konsentrasi terendah (CCRC, 2010).

Pada penelitian ini, konsentrasi tertinggi yang digunakan sebesar 500 µg/ml dan konsentrasi terendah sebesar 31,25 µg/ml dengan angka kelipatan seri konsentrasi 2. Sel yang inaktif dalam wadah ampul diambil dari tangki nitrogen cair dan segera dicairkan pada suhu 37°C kemudian ampul disemprot etanol 70%. Ampul dibuka dan sel dipindahkan ke dalam tabung *conical* steril yang berisi medium RPMI 1640. Suspensi sel disentrifuge 3000 rpm selama 5 menit, kemudian bagian supernatan dibuang, pellet ditambah 1 ml medium penumbuh yang mengandung 10% FBS lalu disuspensikan hingga homogen, selanjutnya sel ditumbuhkan dalam beberapa tissue culture flask kecil (3-4 umbi), diinkubasikan dalam inkubator suhu 37°C CO₂ 5%. Setelah 24 jam, medium diganti dan sel ditumbuhkan lagi hingga konfluen dan jumlahnya cukup untuk penelitian (CCRC, 2010).

Pemanenan Sel

Setelah jumlah sel cukup, medium dibuang dan sel dicuci koloninya dengan cara ditambah larutan PBS dan jika perlu diresuspensikan perlahan, larutan tersebut dibuang, sel ditambah larutan tripsin 2,5% sebanyak 1 ml, agar merata ditambah larutan PBS 3 ml, didiamkan selama sekitar 3-5 menit agar tripsin bekerja dengan baik. Sel dipindah ke dalam tabung *conical* steril dan ditambah PBS sampai volume 10 ml dan disentrifuge 3000 rpm selama 3 menit. Sel dicuci dua kali medium yang sama dan dihitung jumlah selnya menggunakan *haemocytometer*. Suspensi sel ditambah

Seri konsentrasi yang digunakan adalah 31,25; 62,5; 125; 250 dan 500 µg/ml.

Preparasi Sel

dengan sejumlah medium kultur sehingga diperoleh konsentrasi sel sebesar yang diperlukan (CCRC, 2010).

Uji Sitotoksitas

Suspensi sel dalam medium PRF RPMI 1640 sebanyak 100 µl (kepadatan 1,5 x 10⁴ sel/sumuran) dimasukkan ke dalam *plate* 96 sumuran berbeda dan *plate* diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO₂ 5%. Kemudian ditambahkan larutan uji dalam berbagai seri konsentrasi sebanyak 3 replikasi selanjutnya *plate* diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% selama 24 jam pada suhu 37°C. Pada akhir inkubasi, medium pada masing-masing sumuran dibuang dan dicuci dengan PBS kemudian ditambahkan 100 µl medium baru dan 10 µl MTT 0,5% dalam PBS. *Plate* diinkubasi lagi selama 2,5 jam pada suhu 37°C. Sel hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formazan yang berwarna ungu. Formazan dilarutkan dalam larutan SDS, lalu diinkubasi selama 12 jam pada suhu kamar. Serapan dibaca dengan ELISA *reader* gelombang 595 nm (CCRC, 2010).

Analisis Data

Data hasil pembacaan ELISA *reader* berupa absorbansi masing-masing sumuran dikonversikan dalam persentase kehidupan sel. Perhitungan persentase sel hidup menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Persentase kehidupan sel} = \frac{\text{Absorbansi sel dengan perlakuan} - \text{absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi kontrol pelarut} - \text{absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$

Penggunaan rumus perhitungan persentase kehidupan sel tersebut karena absorbansi kontrol pelarut lebih rendah dari absorbansi kontrol sel. Data persentase kehidupan *cell line* T47D yang didapat

digunakan untuk menghitung nilai IC₅₀ yang merupakan potensi kettoksikan ekstrak methanol umbi bit terhadap *cell line* T47D dengan menggunakan analisis probit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

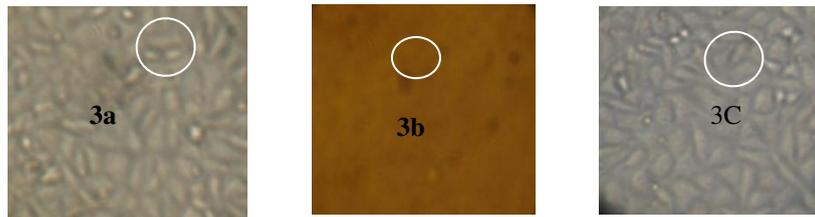
Uji sitotoksitas dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui efek sitotoksik dari ekstrak metanol umbi bit terhadap *cell line* T47D dengan parameter IC_{50} . Uji sitotoksitas secara *in vitro* merupakan model yang biasa digunakan sebagai dasar untuk mempelajari efek molekul antikanker suatu tanaman obat (Wozniak and Keely, 2005).

Uji sitotoksik dilakukan dengan MTT *assay*. MTT *assay* [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], merupakan sistem pengujian secara kolorimetri dengan mengukur jumlah reduksi garam MTT yang berwarna kuning menjadi formazan yang berwarna ungu oleh reduktase suksinat tetrazolium yang termasuk dalam rantai respirasi di mitokondria sel hidup (Mosmann, 1983), dan diukur pada panjang gelombang 595 nm. Intensitas warna yang terbentuk secara langsung sebanding jumlah sel kanker yang hidup. Oleh karena itu, harga absorban

yang diperoleh dapat dikonversi ke dalam persentase sel hidup.

Pengujian dilakukan dengan membuat berbagai tingkat konsentrasi dari larutan uji sebagai berikut : 500, 250, 125, 62,5, dan 31,25 $\mu\text{g/ml}$. Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO (dimetil sulfoksid) karena merupakan pelarut larutan uji. Kontrol negatif ini berfungsi untuk mengetahui apakah pelarut yang digunakan memiliki pengaruh terhadap aktivitas sitotoksik terhadap *cell line* T47D. Kontrol positif yang digunakan adalah doksorubisin karena *cell line* T47D merupakan sel yang sensitif terhadap doksorubisin (Zampieri *et al.*, 2002).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanol umbi bit tidak memiliki aktivitas sitotoksitas terhadap *cell line* T47D yang digunakan dalam penelitian ini (Tabel 1). Hasil uji sitotoksik ekstrak metanol umbi bit terhadap *cell line* T47D dengan metode MTT *assay* dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Efek Perlakuan Ekstrak Metanol Umbi Bit (*Beta vulgaris* L. var. *rubra* L.) Terhadap *Cell Line* T47D dibandingkan dengan kontrol positif dan kontrol negatif

- Cell Line* T47D pada perlakuan larutan uji ekstrak metanol umbi bit konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$ setelah inkubasi 24 jam
- Cell Line* T47D pada perlakuan dengan doksorubisin dosis 100 $\mu\text{g/ml}$
- Cell Line* T47D tanpa perlakuan (kontrol sel)

Gambar 3a menunjukkan bahwa adanya perlakuan ekstrak metanol umbi bit terhadap *cell line* T47D tidak dapat menginduksi adanya kematian sel. Hal ini ditandai bentuk sel yang terlihat sama dengan kontrol sel yaitu memanjang seperti daun yang merupakan ciri dari *cell line* T47D yang hidup, sedangkan sel pada kontrol positif doksorubisin berbentuk bulat yang merupakan ciri dari *cell line* T47D yang mati. Hal ini menggambarkan bahwa pada masing-masing perlakuan dengan ekstrak metanol umbi bit dengan konsentrasi 500-31,25 ($\mu\text{g/ml}$) tidak ada sel yang mati.

Tabel I menunjukkan bahwa adanya perlakuan ekstrak metanol umbi bit terhadap *cell line* T47D tidak dapat menginduksi adanya kematian sel. Hal ini ditandai dengan % kehidupan sel pada berbagai seri konsentrasi yang diujikan yaitu 500-31,25 $\mu\text{g/ml}$ memiliki rata-rata nilai yang lebih dari 100% yang menggambarkan bahwa pada masing-masing perlakuan dengan berbagai seri konsentrasi ekstrak metanol umbi bit tidak ada sel yang mati.

Tabel I. Hasil Uji Sitotoksitas Ekstrak Metanol Umbi Bit Terhadap *Cell Line* T47D

No	Konsentrasi zat aktif ekstrak metanol umbi bit ($\mu\text{g/ml}$)	% Kehidupan sel T47D
1	500	115,91
2	250	119,75
3	125	117,95
4	62,5	108,23
5	31,25	120,69

Hasil yang sangat berbeda terlihat pada data hasil uji sitotoksitas berbagai seri konsentrasi doksorubisin (100-6,25 $\mu\text{g/ml}$) terhadap *cell line* T47D (Tabel II) yang menunjukkan bahwa perlakuan doksorubisin

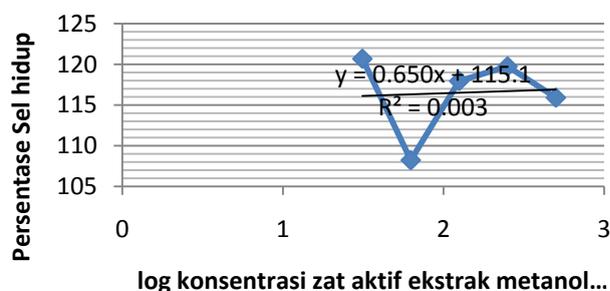
terhadap *cell line* T47D dapat menginduksi adanya kematian sel. Hal ini ditandai dengan % kehidupan sel pada berbagai seri konsentrasi doksorubisin memiliki rata-rata nilai yang kurang dari 100%.

Tabel II. Hasil Uji Sitotoksitas Doksorubisin Terhadap *Cell Line* T47D

No	Konsentrasi doksorubisin ($\mu\text{g/ml}$)	% Kehidupan sel T47D
1	100	35,21
2	50	46,01
3	25	47,42
4	12,5	48,59
5	6,25	48,59

Gambar 4 merupakan grafik hubungan antara log konsentrasi zat aktif ekstrak metanol umbi bit vs persentase kehidupan sel yang bertujuan untuk mendapatkan persamaan regresi linier yang

digunakan untuk mencari nilai IC_{50} . Pada penelitian uji sitotoksitas ini nilai IC_{50} tidak dapat dihitung dengan analisa probit karena nilai persentase kehidupan sel T47D dari berbagai seri konsentrasi melebihi 100%.



Gambar 4. Grafik Efek Perlakuan Ekstrak Metanol Umbi Bit (*Beta vulgaris* L. var. *rubra* L.) terhadap *Cell Line* T47D.

Secara spesifik Escribano *et al* (1998) menyebutkan bahwa aktivitas antioksidan dan antikanker umbi bit terkait dengan kandungan betasianin dan betasantin yang merupakan pigmen utama dari umbi bit (*Beta vulgaris* L. var. *rubra* L.). Betasianin dan betasantin merupakan senyawa golongan flavonoid yang terikat pada gula sehingga bersifat polar dan dapat diekstraksi dengan pelarut metanol (Andersen and Markham, 2006). Namun hasil penelitian ini

menunjukkan bahwa ekstrak metanol umbi bit tidak memiliki efek sitotoksitas terhadap *cell line* T47D. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh beberapa hal, diantaranya : (1) adanya komponen zat-zat lain yang dapat mengganggu aktivitas sitotoksik dari flavonoid tersebut karena komponen di dalam ekstrak metanol masih kompleks. (2) Perlu diketahui bahwa proses maserasi memiliki kelemahan yaitu tidak dapat menyari dengan sempurna, sehingga

bisa dimungkinkan bahwa kandungan flavonoid yang tersari hanya sedikit sehingga kandungan flavonoid yang jumlahnya sedikit khasiatnya akan tertutup oleh kandungan senyawa lain senyawa lain yang ada di ekstrak metanol umbi bit.

KESIMPULAN

Ekstrak metanol umbi bit tidak memiliki aktivitas sitotoksik terhadap *cell line* T47D yang ditandai dengan nilai % kehidupan sel pada berbagai seri konsentrasi yang diujikan memiliki rata-rata nilai 100%. Ekstrak metanol umbi bit tidak mempunyai potensi sitotoksik terhadap *cell line* T47D sehingga tidak dapat dihitung nilai IC₅₀. Hasil uji pendahuluan dan uji KLT menunjukkan bahwa ekstrak metanol umbi bit mengandung senyawa golongan flavonoid.

DAFTAR PUSTAKA

- Andersen, Q.M., and Markham, K.R., 2006, *Flavonoid; Chemistry, Biochemistry and Applications*, CRC Press, USA, 2-11.
- Astawan, M., and Kasih, A.L., 2008, *Khasiat Warna Warni Makanan*, Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, 212-214.
- CCRC, 2010, *Standard Operating Procedure*, Cancer Chemoprevention Research Center Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Davidoff, A. M., Humphrey, P. A., and Iglehart, J. D., 1990, Genetic Basis for p53 Overexpression in Human Breast Cancer, *Proc Natl Acad. Sci, USA*, **87**:51-55.
- Dolinsky, C., 2002, Breast Cancer: The Basics, <http://www.onkolonk.org/types/article.cfm>, diakses 15 Mei 2010.
- Escribano, J., Pedreno, M.A., Carmona, F.G., and Munoz, R., 1998, Characterization of the antiradical activity of betalains from *Beta vulgaris* L.var. *rubra* L. roots, *Phytochemical Analysis*, **9**:3, 124-127.
- Kapadia, G.J., Tokuda, T., Konoshima and Nishino, H., 1996, Chemoprevention of Lung and Skin Cancer by *Beta vulgaris* (Beet) Root Extract. *Cancer Lett.*, **100**: 211-214.
- Maryani, H and Laksmiarti, T., 2003, *Yang Perlu Diperhatikan Tentang Kesehatan Wanita*, Pusat Penelitian dan Pengembangan Pelayanan dan Teknologi Kesehatan, Surabaya.
- Mosmann, T., 1983, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth & Survival: Application to Proliferation & Cytotoxicity Assays, *Journal of Immunological Method*, **65** :59-65.
- Riyasa, K. T. 2001, Hubungan Tingkat Depresi pada Penderita Kanker Mammae yang Menjalani Pengobatan dengan Operasi dan Kombinasi (Operasi dan Radioterapi), *Laporan Tahunan Pusat Penelitian Pengembangan Pemberantasan Penyakit*, ITB-Bandung.
- Schafer, J.M., Lee, E.S., O'Regan, R.M., Yao, K., and Jordan, V.C., 2000, Rapid Development of Tamoxifen-stimulated Mutant p53 Breast Tumors (T47D) in Athymic Mice, *Clinical Cancer Research*, **6**: 4373-4380.
- Schick, Y.K., 2009, Beet, <http://Wikipedia.org>, Diakses tanggal 11 Januari 2010.
- Sunarjono, H., 2009., *Bertanam 30 Jenis Sayur*, Swadaya, Jakarta, 106.
- Tyagi, A.K., Agarwal, C., Chan, D.C.F and Agarwal, R., 2004, Synergistic Anti Cancer Effects of Silibinin with Conventional Cytotoxic Agents Doxorubicin, Cisplatin dan Carboplatin against Human Breast dan MDA-MB 468 Cells, *Oncology Report*, **13**:1-11.
- Winkler, C., Wirleitner, B., Schroecksnadel, K., Schennach, H., dan Fuchs, D., 2005, In vitro Effects of Beet Root Juice on Stimulated and Unstimulated Peripheral Blood Mononuclear Cells, *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, **1**: 180-185.
- Wozniak, M. A., Keely, P. J., 2005, 'Use of Three-Dimensional Collagen Gels To Study Mechanotransduction in T47D Breast Epithelial Cell', *Biol. Proced. Online* **7**:144-161.
- Zampieri, L., Bianchi, P., Ruff, P., and Arbuthnot, P., 2002, Differential modulation by estradiol of P-glycoprotein drug resistance protein expression in cultured MCF7 and T47D breast cancer cells, *Anticancer Res.*, **22**(4):2253-9.