

EFEK SITOTOKSIK EKSTRAK DIETIL ETER HERBA PEGAGAN EMBUN (*Hydrocotyle sibthorpioides* Lmk.) TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA MCF-7

Agustina Setiawati^{*}), Yohanes Dwiatmaka

Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta

Abstract: *Triterpenoid saponin, hydrocosaponin A-F, isolated compound from Hydrocotyle sibthorpioides Lmk. performed cytotoxic activity on KB, Daoy and WiDr cancer cells. Methanolic extract of this herb was also investigated in inhibiting cancer development on liver and cervical cancer. Therefore, it is potential to be developed as chemopreventive agent. The objective of this study is to determine cytotoxic activity and compound in diethyl ether extract of Hydrocotyle sibthorpioides Lmk. herbs. The cytotoxic effect of extract on MCF-7 breast cancer cell line was assayed using MTT method while phytochemical analysis was observed using normal phase Thin Layer Chromatography (TLC). Diethyl ether extract of Hydrocotyle sibthorpioides had cytotoxic effect on MCF-7 cells with IC50 365 µg/mL. TLC analysis observed that the extract contain flavonoid compounds.*

Keywords : *Hydrocotyle sibthorpioides, MCF-7, cytotoxic, flavonoid*

1. Pendahuluan

Kanker merupakan penyakit seluler dengan karakteristik proliferasi sel yang tidak terkontrol (Hanahan dan Weinberg, 2000). *American Cancer Society* memperkirakan terdapat 1.479.350 kasus kanker yang terdiagnosa pada tahun 2009. Jenis kanker yang paling banyak diderita perempuan adalah kanker payudara (26% dari seluruh kasus kanker), dan 15% kasus menyebabkan dengan kematian (Jemal dkk., 2007). Di Indonesia, kanker payudara merupakan kanker terbesar kedua setelah kanker serviks (Idamardi, 2007). Pengembangan terapi efektif dalam pengobatan kanker payudara sangat diperlukan untuk menekan jumlah kematian penderita.

Pengobatan kanker yang efektif dan efisien belum ditemukan (Sugiyanto, 2003). Terapi yang digunakan untuk pengobatan kanker payudara antara lain pembedahan kemoterapi, imunoterapi, radiasi dan *hormone replacement therapy* (HRT). Pembedahan tidak efektif lagi untuk sel yang telah bermetastasis. Radioterapi dan kemoterapi bekerja tidak selektif dan tidak aman untuk sel normal (King, 2000). Penemuan obat baru sebagai agen antikanker dan atau kemopreventif yang selektif

perlu dilakukan untuk mengatasi hal tersebut, diantaranya dengan menggunakan bahan alam yang telah dimanfaatkan dalam pencegahan maupun pengobatan kanker (Walaszek dkk., 2004).

Herba pegagan embun mengandung saponin triterpenoid (Matsushita dkk., 2004) yang terbukti memacu apoptosis melalui sitokrom C pada beberapa jenis sel kanker (Liu dkk., 2000). Saponin triterpen dalam *H. sibthorpioides*, *hydrocosaponin* A-F terbukti mempunyai aktivitas sitotoksik sedang pada sel KB, Daoy dan WiDr (Huang dkk.^b, 2008). Ekstrak metanol *H. sibthorpioides* terbukti menghambat pertumbuhan kanker pada tikus yang ditransplantasi karsinoma hepar (S₁₈₀) dan karsinoma leher rahim (U₁₄) (Yu dkk., 2007). Dengan demikian, pegagan embun (*Hydrocotyle sibthorpioides* Lmk.) berpotensi sebagai agen kemopreventif.

Sel kanker payudara MCF-7 memiliki overekspresi Bcl-2 sehingga menghambat apoptosis dan cenderung menimbulkan resistensi terhadap agen sitotoksik (Weigert dkk., 2007). Resistensi sel MCF-7 juga disebabkan karena ekspresi protein P-glikoprotein (PgP) yang

*Email korespondensi: nina@usd.ac.id

mentransport keluar obat-obat sitotoksik seperti doxorubicin, paclitaxel, vinkristin (Wong dkk., 2006). Sel MCF-7 sesuai untuk digunakan sebagai model dalam skrining suatu senyawa sebagai agen kemopreventif.

Penelitian efek sitotoksik ekstrak dietil eter herba pegagan embun (*Hydrocotyle sibthorpioides* Lmk.) terhadap sel kanker payudara MCF-7 dilakukan untuk mengetahui efek antikanker herba pegagan embun (*Hydrocotyle sibthorpioides* Lmk.). Penelitian ini merupakan usaha skrining bahan alam sebagai agen kemopreventif yang lebih selektif dan aman digunakan pada pasien kanker.

2. Metode Penelitian

Bahan berupa herba pegagan embun yang telah berbunga dan tumbuh liar, diperoleh dari lingkungan kampus Universitas Sanata Dharma, Paingan, Maguwoharjo, Depok, Sleman. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi adalah dietileter teknis. Sel kanker payudara MCF-7 *cell line* yang digunakan merupakan koleksi CCRC (*Cancer Chemoprevention Research Center*) Fakultas Farmasi UGM. Sel ini ditumbuhkan dalam medium penumbuh DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's Medium*) yang mengandung FBS (*Fetal Bovine Serum*) 10% dan penisilin-streptomisin 1% (Gibco). Ekstraklarutkan dalam Dimetil Sulfoksida (DMSO) (Sigma) dengan konsentrasi tidak lebih dari 0,7%. Reagen MTT [3-(4,5-dimetil thiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida]. Larutan induk 5mg/mL dibuat dengan melarutkan MTT (Sigma, Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA) dalam *phosphat buffer saline* (PBS). Pereaksi akrudin oranye-etidium bromida (AE). Larutan induk dibuat dari 50 mg etidium bromida (Sigma, Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA) dan 15 mg akrudin oranye (Sigma, Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA) dilarutkan dalam 1 mL metanol 95%, ditambah 49 mL akuabides.

Alat yang digunakan untuk kerja *in vitro* adalah: *autoclave* (Hirayama HV-25 020585175, Hirayama Manufacturing Co., Jepang), *laminar air flow* (LAF) *hood* (Labconco, Gelman Sciences), inkubator CO₂ (Heraeus), *inverted microscope* (Zeiss MC 80), *haemocytometer* (Nebauer improved 0,100 mm Tiefe Depth Profondeur 0,0025 mm², Germany), *cell counter*, penangas air (Memmerth), neraca analitik (Ohaus), mikropipet (Pipetman[®] neo Gilson, France), *ELISA reader* (Bio-Rad

microplate reader Benchmark serial no. 11565, Jepang), *flowcytometer* (FACS-Calibur), mikroskop cahaya (Nikon YS100), mikroskop fluoresens, sentrifus (Sorvall, MC 12 V 9700869) dan vortex (Maxi Mix II, Thermolyne type 37600 mixer, Iowa, USA). Kamera digital (Canon Power Shoot A460, 5,0 megapiksel) digunakan untuk mendokumentasikan pengamatan sel kanker secara mikroskopis.

Selain alat-alat di atas, alat habis pakai yang digunakan dalam kerja *in vitro* antara lain: *tissue culture flask* (25cm² Canted Neck, Nunc), *tissue culture dish* diameter 10 cm (Iwaki), *conical tube* 15 mL (BD Falcon), *yellow tip* dan *blue tip* (Axigen), *96-well plate* (Nunc), *microplate* (96 well, Iwaki) dan *coverslip* diameter 13 mm (Thermanox[®]).

2.1 Pembuatan simplisia dan ekstraksi

Herba tumbuhan pegagan embun terlebih dahulu dibersihkan dari debu dan kotoran dengan air mengalir. Herba pegagan embun dikeringkan dengan oven berkipas pada 40°C, selanjutnya diserbuk dan diayak sehingga diperoleh serbuk herba pegagan embun yang cukup halus. Serbuk herba pegagan embun dimaserasi menggunakan dietileter 3 x 24 jam, filtrat (maserat) dikumpulkan menjadi satu. Maserat kemudian dipekatan menggunakan *vaccum rotary evaporator* menjadi ekstrak kental yang kemudian dikeringkan dengan *freeze dryer* untuk mendapatkan ekstrak kering. Dua macam ekstrak kering inilah yang selanjutnya digunakan untuk uji sitotoksik dan uji pemacuan apoptosis.

2.2 Analisis Kandungan Fitokimia dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Metode KLT dilakukan menggunakan sistem fase normal dengan menggunakan fase diam yang lebih polar dibandingkan fase gerak. Fase diam yang digunakan adalah *plate* selulosa. Fase gerak dalam sistem ini adalah n-butanol:asam asetat:air (5:1:4 v/v). Sampel sebanyak 1 µL ditotolkan menggunakan Camag's linomat pada 15 mm dari dasar *plate*. *Plate* kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* Wheaton yang telah dijenuhi dengan fase gerak. Elusi fase gerak dilakukan sepanjang 150 mm. *Plate* kemudian dikeringkan sampai semua fase gerak menguap pada suhu kamar dan dilakukan deteksi uap ammonia pada sinar tampak.

2.3 Uji Sitotoksik

Uji sitotoksik dilakukan menurut penelitian sebelumnya oleh Setiawati dkk. (2011), Setiawati (2011) dan Setiawati dkk. (2014). Sel dengan kepadatan populasi 5×10^3 sel/100 μ L didistribusikan ke dalam 96 well plate selanjutnya diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO₂ untuk beradaptasi dan menempel pada sumuran. Larutan ekstrak dilarutkan dalam DMSO 1% sebagai stok, kemudian diencerkan dengan media kultur hingga konsentrasi tertentu. Larutan ekstrak sebanyak 100 μ L dimasukkan sumuran dan diinkubasi selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, media dalam sumuran dibuang, kemudian ditambahkan PBS 100 μ l tiap sumuran untuk pencucian dengan PBS, lalu PBS dibuang. Selanjutnya, pada masing-masing sumuran ditambahkan MTT 5 mg/mL dalam 100 μ l media kultur. Inkubasi MTT dilakukan selama 3 jam pada suhu 37°C agar MTT diabsorpsi sempurna oleh sel hidup. Setelah inkubasi, larutan MTT dibuang dengan membalik plate, kemudian ditambahkan stopper SDS untuk melarutkan garam formazan. Sel diinkubasi selama 24 jam dalam suhu kamar dan terlindung dari cahaya. Pada akhir inkubasi plate digoyang menggunakan shaker selama 15 menit, kemudian plate dibaca dengan ELISA reader pada λ 595 nm.

2.4 Analisis Data

Nilai *Inhibition Concentration*₅₀ (IC₅₀) merupakan konsentrasi yang menyebabkan penghambatan pertumbuhan 50% populasi sel sehingga dapat diketahui potensi sitotoksitasnya (Doyle dan Griffiths, 2000). Dalam perhitungan IC₅₀, diperlukan data absorbansi masing-masing sumuran yang kemudian dikonversi ke dalam persen viabilitas sel. Persen viabilitas sel (sel yang hidup) dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ viabilitas} = \frac{\text{abs SP} - \text{abs KM}}{\text{abs KS} - \text{abs KM}} \times 100 \%$$

Keterangan:

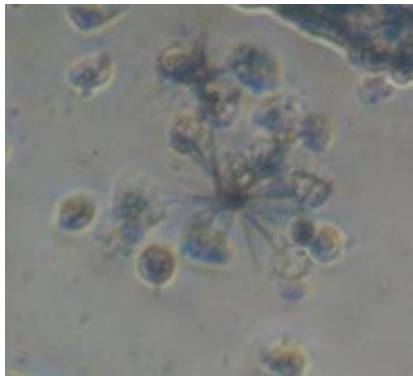
abs SP = absorbansi sel dengan perlakuan
 abs KM = absorbansi kontrol media
 abs KS = absorbansi kontrol sel

Nilai IC₅₀ dihitung dengan bantuan program *Microsoft Excell* 2013 dari persamaan garis regresi linier hubungan antara log konsentrasi dengan persen viabilitas sel (Setiawati, 2011).

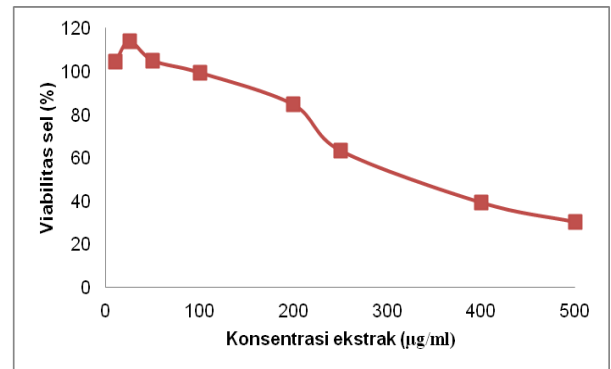
3. Hasil dan Pembahasan

Dalam penelitian ini, viabilitas sel dianalisis dengan metode MTT. Garam MTT diabsorpsi oleh sel hidup dan dipecah oleh suksinat dehidrogenase yang termasuk dalam rantai respirasi di mitokondria, menjadi formazan (Gambar 1) (Doyle dan Griffiths, 2000). Absorban yang dihasilkan oleh formazan berbanding lurus dengan jumlah sel yang hidup. Metode MTT lebih sensitif dibandingkan dengan metode sitotoksik lain seperti metode LDH dan metode protein (Fotakis dan Timbrell, 2006). Hasil uji memperlihatkan bahwa ekstrak dietileter herba pegagan embun memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel MCF-7 dengan persamaan regresi $Y = -0,1814x + 116,16$ ($R^2=0,9798$) dan harga IC₅₀ 365 μ g/mL Aktivitas sitotoksik ekstrak dietileter pegagan embun bersifat *dose dependent* (Gambar 2).

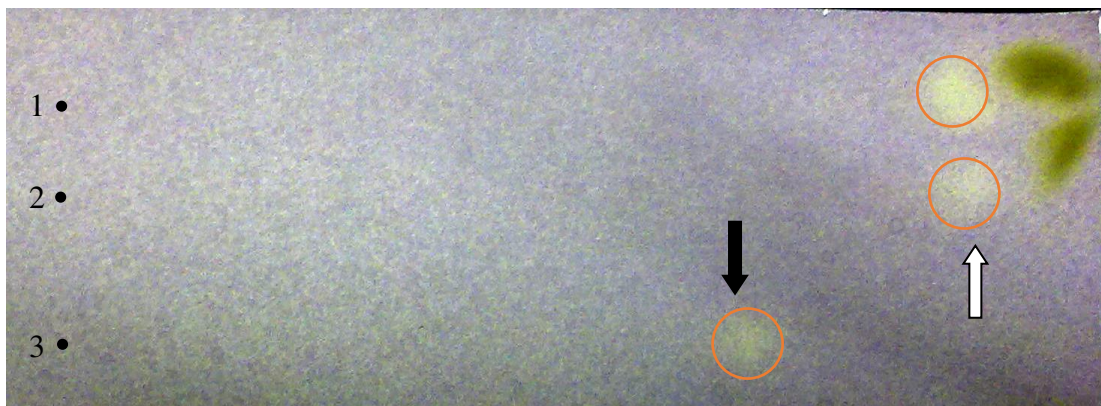
Dalam penelitian ini juga dilakukan analisis kandungan fitokimia dari ekstrak dengan metode KLT fase normal (Gambar 3). Berdasarkan hasil KLT, didapatkan informasi bahwa senyawa yang terdapat dalam ekstrak adalah golongan senyawa flavonoid yang mempunyai tingkat kepolaran lebih tinggi dibandingkan rutin. Sebaliknya, hasil penelitian Huang dkk.^b (2008) menyebutkan bahwa pegagan embun mengandung senyawa-senyawa yang relatif kurang polar dibandingkan flavonoid antara lain: saponin triterpen tipe oleanan, hidrocosaponin A-F yang mempunyai 3 gugus D-glukosa dan 1 gugus L-arabinosa. Senyawa-senyawa terpen tersebut larut dalam pelarut semi-polar seperti dietil eter. Kompleksitas kandungan senyawa dalam ekstrak kemungkinan menyebabkan efek sitotoksik ekstrak tersebut tidak spesifik sehingga IC₅₀ dari ekstrak tersebut terlalu tinggi. Oleh karena itu, diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai kandungan senyawa dalam ekstrak dietil eter pegagan embun.



Gambar 1. Formazan yang terbentuk oleh reaksi Enzim Suksinat Dehidrogenase dan MTT



Gambar 2. Efek ekstrak dietil eter herba pegagan embun (*Hydrocotyle sibthorpioides* Lmk.) terhadap viabilitas sel kanker payudara MCF-7



Gambar 2. Kromatogram KLT ekstrak dietileter herba pegagan embun setelah dideteksi dengan uap ammonia pada sinar visibel

Keterangan:

1, 2 : ekstrak dietil eter

3 : standard rutin

➡ : bercak flavonoid rutin; ⇨ : bercak diduga flavonoid

4. Kesimpulan

Ekstrak dietil eter herba pegagan embun (*Hydrocotyle sibthorpioides* Lmk.) mempunyai efek sitotoksik yang bersifat *dose-dependent* terhadap sel kanker payudara MCF-7.

Ucapan Terima Kasih

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat, Universitas Sanata Dharma yang telah membiayai penelitian ini melalui Hibah Penelitian Internal tahun anggaran 2010 dengan nomor kontrak 222/LPPM USD/X/2010.

DAFTAR PUSTAKA.

- Doyle, A. and Griffiths J.B., 2000, *Cell dan Tissue Culture for Medical Research*, John Willey & Sons LTD, England.
- Francis, G., Kerem, Z., Harrinder, P.S., Makkar, Becker, K., 2002, *British Journal of Nutrition*, 88: 587- 605.
- Gewies, 2003, Introduction to Apoptosis, *ApoReview*, 3 (1):1-26.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A., 2000, The hallmark of cancer, *Cell*, 100, 57-70.
- Huang, H., Liauw, C., Zhang, L., Ho, H., Kuo, L.Y., shen, Y., Kuo, Y.^a, 2004, Triterpenoidal saponins from *Hydrocotyle sibthorpioides*, *Phytochemistry*, 69(7): 1597- 1603.
- Huang, S., Huang, G., Ho, Y., Lin, Y., Hung, H., Chang, T., Chang, M., Chen, J., Chang, Y., 2008, Antioxidant

- and Antiproliferative Activities of the Four Hydrocotyle species from Taiwan, *Botanical Studies.*, 49: 311- 322.
- Huang, C., Liaw, CC., Zhang, L., Ho, H., Kuo, L., Shen, Y., Kuo, Y., 2008, Triterpenoidal saponins from *Hydrocotyle sibthorpioides*, *Phytochemistry*, 69(7): 1597- 1603.
- Idamardi, 2007, *Kanker Payudara*, Yayasan Kanker Payudara Indonesia, Jakarta.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Jiaquan Xu and Michael J.T. 2007. Cancer Statistic 2007, *CA Cancer J Clin.*, 57: 43-66.
- King, R.J.B., 2000, *Cancer Biology*, 2nd edition., Pearson Education Limited, London.
- Matsushita A, Sasaki Y, Warashina T, Miyase T, Noguchi H, Velde D., 2004, *New oleanane saponins from hydrocotylesibthorpioides*, 5: 1-6.
- Mechetner, E., Kyshtoobayeva, A., Zonis, S., Kim, H., Stroup, R., Garcia, R., Parker, R.J., and Fruehauf, J.P., 1998, Levels of Multidrug Resistance (MDR1) P-Glycoprotein Expression by Human Breast Cancer Correlate with *in vitro* Resistance to Taxol and Doxorubicin, *Clinical Cancer Research*, 4, 389-398.
- Schwartz, G.K. and Shah, M.A. 2005. Targeting the Cell Cycle: A New Approach to Cancer Therapy. *J Clin Oncol.* 2: 9408-9421.
- Shigematsu, N., Kuono, I., Kawano, N., 1982, Quercetin 3-(6"-caffeoylgalactoside) from *Hydrocotyle sibthorpioides*, *Phytochemistry*, 21(8): 2156- 2158.
- Setiawati, A., Susidarti RA., Meiyanto, E., 2010, Peningkatan Efek Sitotoksik Doxorubicin oleh Hesperidin pada Sel T47D, *Bionatura*, 13(2): 85- 92.
- Setiawati, A., 2011, Aktivitas Sitotoksik dan Induksi Apoptosis Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L) terhadap Sel Kanker Payudara (T47D), *Jurnal Farmasi Sains dan Komunitas*, 7(2): 617- 622.
- Setiawati, A., Riswanto, FDO., Yuliani, SH., Istyastono, EP., 2014, Anticancer Activity of Mangosteen Pericarp Dry Extract towards MCF-7 Breast Cancer Cell Line through Estrogen Receptor- α , *Indo. J Pharm.*, 25(3): 119- 124.
- Sugiyanto, Sudarto, B., Meiyanto, E., Nugroho, A.E., dan Jenie U.A., 2003, Aktivitas Antikarsinogenik Senyawa yang Berasal dari Tumbuhan, *Majalah Farmasi Indonesia*, 14(4): 216-225.
- Walaszek, Z., Hanausek, M., and Slaga, T.J., 2004, Mechanisms of Chemoprevention, *Suppl. Am. Coll. Phys.*, 125, 128-133.
- Weigert A., Tziepy N., Knethen A., Johann A., Schmidt H., Geisslinger G., dan Brune B., 2007, Tumor Cell Apoptosis Polarizes Macrophages—Role of Sphingosine-1-Phosphate, *Molecular Biology of the Cell*, 18 : 3810–3819, Germany
- Wong., Bendayan., Rauth., Xue., Babakhaniyan., & Wu, 2006, A Mechanistic Study of Enhanced Doxorubicin Uptake and Retention in Multidrug Resistant Breast Cancer Cells Using A Polymer-Lipid Hybrid Nanoparticle System, *The Journal of Pharmacology dan Experimental Therapeutics*, 317 (3), 1372-1381.
- Yu, F., Yu, F., Mo, P.M., Guire, R., Li, R., Wang, R., 2007, Effect of *Hydrocotyle sibthorpioides* extract on transplanted tumor and immune function in mice, 14(2): 166- 171.
- Zeiss, C.J, 2003, The Apoptosis-Necrosis Continuum: Insights from Genetically Altered Mice. Review. *Vet Pathol.* 40:481-495.