Efek Sitotoksik dan Penghambatan Kinetika Proliferasi Ekstrak Etanol Kulit Batang Beringin Pencekik (Ficus annulata,BI) dan Epirubicin Sebagai Agen Ko-Kemoterapi Terhadap Sel Kanker Payudara T47D

By Nunuk Aries Nurulita

WORD COUNT 2240 TIME SUBMITTED 01-MAR-2019 08:38AM
PAPER ID 44799618

Efek Sitotoksik dan Penghambatan Kinetika Proliferasi Ekstrak Etanol Kulit Batang Beringin Pencekik (*Ficus annulata*,BI) dan Epirubicin Sebagai Agen Ko-Kemoterapi Terhadap Sel Kanker Payudara T47D

Siti Mulyanah[1], Elza Sundhani[1,2], Nunuk Aries Nurulita[1,3]

Cancer and Stem Cells Research Center, Universitas Muhammadiyah Purwokerto, Jl. Raya Dukuhwaluh, Kembaran, Purwokerto 53182, Indonesia

[2]Bagian Farmakologi dan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Purwokerto, Jl. Raya Dukuhwaluh, Kembaran, Purwokerto 53182, Indonesia

[3]Bagian Kimia Organik, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Purwokerto, Jl. Raya Dukuhwaluh, Kembaran, Purwokerto 53182, Indonesia

*Email korespondensi : elzasundhani1991@gmail.com

ABSTRAK

Latar belakang: Kanker payudara merupakan salah satu jenis kanker dengan angka kematian yang paling tinggi. Pengobatan kanker payudara menggunakan kemoterapi golongan antrasiklin menunjukkan adanya resistensi dan efek samping berupa toksisitas jantung, sehingga diperlukan metode untuk meningkatkan sensitivitas epirubicin (golongan antrasiklin) dan menurunkan efek sampingnya dengan cara kombinasi dengan senyawa kemoprevensi dari bahan alam.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk menentukan efek sitotoksik dan efek penghambatan kinetika proliferasi kombinasi antara ekstrak etanol kulit batang beringin pencekik (EEKBBP) dengan epirubicin (EPI),

Metode: Tahapan penelitian ini terdiri dari pembuatan ekstrak kulit batang beringin pencekik menggunakan metode maserasi dengan pelarut ethanol 96% dan skrining metabolit sekunder. Kultur sel T47D dilakukan dalam media kultur *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), dilanjutkan perlakuan EEKBBP dan EPI tunggal maupun kombinasi, pengamatan morfologi sel T47D setelah perlakuan dengan inkubasi 24 jam menggunakan metode *Microculture Tetrazolium Technique* (MTT) serta uji penghambatan kinetika profilerasi dengan metode *doubling time*. Analisa data dilakukan dengan menghitung nilai IC_{50} (*Inhibition concentration 50*) dan *Combination Index* (CI) kemudian dilanjutkan perhitungan % viabilitas sel dari masing masing perlakuan untuk mengetahui kemampuan penghambatan kinetika proliferasi.

Hasil penelitian: Hasil skrining metabolit sekunder dari EEKBBP positif mengandung golongan senyawa saponin, flavoniod, triterpenoid dan alkaloid. EEKBBP dan EPI memiliki aktivitas sitotoksik dengan nilai IC_{50} 374,663 µg/mL dan IC_{50} 277,615 Nm/mL. Kombinasi EEKBBP 200 µg/mL (1/2 IC_{50}) dan EPI 20 nM/µL (1/8 IC_{50}) menunjukkan nilai sinergisitas dengan nilai CI 0,42. Hasil uji proliferasi pada sel T47D menunjukan adanya penurunan jumlah % viabilitas sel pada inkubasi jam ke 0 hingga jam ke 42 dibandingkan dengan kontrol sel dengan nilai yang baik dibandingkan dengan perlakuan EEKBBP dan EPI tanpa kombinasi.

Kesimpulan: Kombinasi EEKBBP dan EPI memiliki efek sitotoksik dan sinergis dalam membunuh sel kanker payudara T47D, serta kombinasi keduanya menunjukkan sifat antiproliferatif yang lebih baik dibandingkan dengan perlakuan tunggal.

Kata Kunci: *Ficus annulata*,BI, Epirubicin, Sel T47D, *Combination Index*

PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyakit yang ditandai pembelahan sel tidak terkendali dan kemampuan sel menyerang jaringan biologis lainya. Pertumbuhan yang tidak terkendali tersebut disebabkan kerusakan DNA yang menyebabkan mutasi di gen vital yang mengontrol pembelahan sel. Sel kanker kehilangan fungsi kontrolnya terhadap regulasi daur sel maupun fungsi homeostasis sel pada organisme multiselular sehingga sel tidak dapat berproliferasi secara normal. Akibatnya, sel akan berproliferasi terus menerus sehingga menimbulkan pertumbuhan jaringan yang abnormal (Diandana, 2009).

Kanker payudara merupakan salah satu jenis tumor ganas terbanyak pada perempuan dengan angka kejadian sebanyak 22% dari kasus baru kanker pada perempuan. Pengobatan yang secara umum dilakukan pada kanker yaitu pembedahan, radioterapi dan kemoterapi (Apantaku, 2002). Epirubicin adalah senyawa golongan antrasiklin, merupakan antibiotik dengan spektrum luas yang memberikan efek antitumor melalui gangguan pada sintesis dan fungsi DNA. Studi klinis menunjukan aktivitas Epirubicin pada kanker payudara, limfoma non-Hodgkin, kanker ovarium, sarkoma jaringan lunak, dan kanker pankreas. Terdapat pula bukti aktivitas terhadap kanker lambung, kanker paru-paru sel kecil, dan leukemia akut (Cersosimo dan Hong, 1986). Namun, pada sebagian besar kasus kemoterapi kanker, banyak regimen kemoterapi yang mengandung antrasiklin mencapai resistensi obat atau meningkatkan toksisitas jantung, sehingga diperlukan metode untuk meningkatkan sensitivitas epirubicin dan menurunkan efek samping.

Salah satu bahan alam yang dapat dijadikan sebagai agen ko-kemoterapi adalah Beringin pencekik (*Ficus annulata,*BI). Daun beringin pencekik berkhasiat sebagai obat sakit demam, dan akarnya untuk obat sakit lepra (Zuhud, 2013). Daun, akar dan kulit batang beringin pencekik mengandung flavonoid dan polifenol. Penelitian yang dilakukan Poeloengan *et al* (2006) membuktikan bahwa kulit batang beringin pencekikmengandung beberapa senyawa diantaranya alkaloid, steroid/ triterpenoid, flavonoid, dan saponin. Flavonoid telah diketahui memiliki aktivitas antioksidan dan antiproliferatif (Kuo YC *et al*.,2005). Alkaloid, triterpenoid menunjukan sifat menghambat pertumbuhan kanker dan menghilangkan efek buruk kemoterapi(Harfia, 2006). Sehingga penelitian ini dilakukan untuk melihat efek sitotoksik dan efek penghambatan kinetika proliferasi kombinasi antara ekstrak etanol kulit batang beringin pencekik (EEKBBP) dengan epirubicin (EPI).

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman Beringin pencekik *(Ficus annulata,*BI*)* yang diperoleh dari daerah Watukumpul, pemalang, Jawa tengah. Bagian tanaman yang digunakan yaitu kulit batang beringin pencekik yang kemudian diidentifikasi di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman.

Bahan yang digunakan untuk uji skrining metabolit sekunder antara lain larutan besi (III) klorida 10 %, HCL 2 N, serbuk Mg, asam klorida pekat, pereaksi Dragendroff, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, asam asetet anhidrat, etanol, asam sulfat pekat.

Bahan untuk uji sitotoksik dan penghambatan kinetika proliferasi antara lain sel line kanker payudara T47D yang diperoleh dari *Cancer Chemoprevention Research Center* (CCRC), Fakultas Farmasi UGM. Media pertumbuhan kultur sel *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) yang mengandung *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10 % (v/v) *(Sigma)*, penisillin-streptomisin 1 % (v/v) *(Gibco)*, *Microculture Tetrazolium Technique* (MTT) dan SDS 10 % dalam 0.1 N HCL, *epirubicin* (PT. Kalbe Farma, Tbk.).

Metode

Ekstraksi dan skrining metabolit sekunder

Sebanyak 100 gram serbuk dimaserasi dengan etanol 96% (1:10 b/v) dan dilakukan remaserasi. Ekstrak kental diperoleh dengan cara menguapkan filtrat menggunakan *rotary evaporator* dibantu dengan *waterbath* padasuhu 40^{o}C. Analisis senyawa flavonoid dengan menambahkan serbuk seng 2 mL HCL 2N, HCL (p), selama 2 sampai 5 menit warna jingga sampai warna merah intensif muncul menunjukan adanya flavonoid (glikosida-3-flavonol) (Anonim, 1995). Analisis senyawa saponin menggunakan metode Forth, parameter positif saponin yang digunakan adalah terbentuknya busa yang mantap (tidak hilang selama 30 detik) (Marliana *et al*, 2005). Analisis adanya senyawa alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih pada tabung reaksi setelah sampel ditambah pereaksi Mayer dan endapan merah kecoklatan ketika sampel ditambahkan pereaksi Wagner (Farnsworth, 1966). Sedangkan analisis senyawa triterpenoid yaitu dengan terbentuknya cincin kecoklatan pada perbatasan larutan sampel setelah ditambah dengan kloroform dan asam asetat anidrat, (Ciulei, 1984).

Uji Sitotoksik Tunggal dan Kombinasi Menggunakan Metode MTT

Sel T47D dengan konsentrasi 10^4 sel/sumuran didistribusikan ke dalam 96 *well plate* dan diinkubasikan selama 24 jam. Dicuci dengan FBS, ditambahkan sebanyak 100 µl seri konsentrasi EEKBBP dan Epirubicin baik tunggal maupun kombinasi. Setelah diinkubasi selama 24 jam media kultur dibuang dan dicuci menggunakan FBS. Reagen MTT yang digunakan sebanyak 100 µl (0.5 mg/ml), kemudian inkubasi 4 jam pada suhu 37^{0}C. MTT dibuang dan ditambahkan larutan stopper 100 µl SDS 10% dalam 0.1 N HCl. Sel diinkubasi semalam kemudian dibaca dengan ELISA *reader* pada λ 595 nm.

Uji Proliferasi dengan *Doubling time*

Sel T47D dengan kepadatan 10^4 sel/sumuran didistribusikan ke dalam sumuran dan diinkubasi 24 jam. Sel diberi perlakuan tunggal dari seri konsentrasi EEKBP dan Epirubicin kemudian inkubasi selama 0, 24, 48 jam. Pada akhir waktu inkubasi, medium diambil dan sel dicuci PBS 1x. Ditambahkan reagen 100 µL MTT (0.5 mg/ml) ke dalam setiap sumuran, termasuk kontrol media (tanpa sel) dan diinkubasikan selama 4 jam hingga terbentuk kristal formazan yang ungu. Sel ditambah reagen stopper SDS 10% dalam 0.1 N HCl dan diinkubasi semalam kemudian dibaca dengan ELISA *reader* pada λ 595 nm.

Analisa Data

Perolehan data absorbansi dari tiap uji digunakan untuk menghitungviabilitas sel (prosentase sel hidup) menggunakan rumus:

$$\text{hidup} = \frac{\text{Absorbansi kontrol sel} - \text{Absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$

Nilai IC_{50} (*Inhibition concentration 50*) ditentukan dengan persamaan logaritma antara nilai absorbansi dengan konsentrasi. Sedangkan nilai *Combination Index* (CI) ditentukan dengan menggunakan persamaan:

$$CI = (D)_1/(Dx)_1 + (D)_2/(Dx)_2$$

Keterangan:

Dx : konsentrasi dari satu senyawa tunggal yang dibutuhkan untuk memberikan efek sebesar efek kombinasi.

D_1, D_2 : konsentrasi kedua senyawa untuk memberikan efek yang sama). (Notarbarkolo,dkk., 2005).

Interpretasi nilai CI

Nilai CI	Interpretasi
<0,1	Efek sinergis sangat kuat
0,1 – 0,3	Efek sinergis kuat
0,3 – 0,7	Efek sinergis
0,7 – 0,9	Efek sinergis ringan – sedang
0,9 – 1,1	Mendekati efek aditif
1,1 – 1,45	Efek antagonis ringan – sedang
1,45 – 3,3	Efek antagonis
>3,3	Efek antagonis kuat – sangat kuat

HASIL DAN PEMBAHASAN

Randemen ekstrak yang diperoleh dari 100 gram serbuk kulit batang beringin pencekik adalah sebesar 7,653%. Skrining senyawa metabolit sekunder bertujuan untuk mengetahui kandungan kimia dari ekstrak etanol kulit batang beringin pencekik. Hasil skrining metabolit sekunder dari EEKBBP positif mengandung golongan senyawa saponin, flavoniod, triterpenoid dan alkaloid (Tabel 1).

Uji sitotoksik dilakukan pada sel kanker payudara T47D dengan pemberian perlakuan epirubicin dan ekstrak etanol kulit batang beringin pencekik. Sel T47D ini ditumbuhkan pada media DMEM dengan suhu 37°C. Pemilihan pelarut untuk uji berupa DMSO karena pada konsentrasi rendah relatif tidak memberikan pengaruh pada *cell viability* T47D. Hal ini menunjukkan bahwa kematian sel ataupun penghambatan pertumbuhan sel bukan akibat pengaruh DMSO melainkan karena pengaruh sampel uji yang digunakan dalam penelitian.

Perlakuan terhadap sel dilakukan dengan waktu inkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO_2 dengan tujuan sampel dapat berinteraksi dengan sel kanker T47D. Uji sitotoksik dan uji penghambatan kinetika proliferasi Reagen MTT merupakan garam tetrazolium yang bersifat

larut dalam air dengan menghasilkan larutan berwarna kuning. Dimana prinsip metode MTT yaitu kerja enzim mitokondria pada sel aktif dengan adanya enzim *dehydrogenase* yang dapat memetabolisme garam tetrazolium. Metabolisme tersebut dapat menyebabkan tetrazolium berubah menjadi formazan ya tidak larut dalam air namun dapat larut dalam SDS 10 % dan berwarna ungu. Sehingga sel yang hidup akan membentuk kristal formazan (ungu) dan sel yang mati tidak membentuk kristal formazan (kuning) (Doyle dan Griffiths, 2000).

Pada pengujian ini, nilai sitotoksisitas EEKBBP terhadap sel kanker payudara T47D pada rentang konsentrasi 50–1000 µg/mL didapatkan nilai IC_{50} dengan analisis menggunakan spss *probit* sebesar 397,3 µg/mL. Selain itu EEKBBP juga terbukti memliki aktivitas antiproliferatif terhadap sel kanker payudara MCF-7 dengan nilai IC_{50} sebesar >400 µg/mL (Subarnas, 2012). Sedangkan nilai IC_{50} epirubicin dari rentang konsentrasi epirubicin 25 – 500 nM/µL yaitu 227,615 nM/µL. Perlakuan EEKBBP dan epirubicin sebagai kontrol positif (Tabel 1) selama 24 jam mengakibatkan penurunan % viabilitas yang terjadi seiring dengan peningkatan konsentrasi dari masing-masing EEKBBP dan epirubicin.

Metode yang digunakan untuk mengevaluasi kombinasi menggunakan *Combination Index* (CI). Hasil dari CI menggambarkan efikasi (keefektifan) kombinasi. Untuk mengetahui potensi penggunaan EEKBBP sebagai agen ko-kemoterapi bagi epirubicin pada sel kanker payudara T47D dilakukan dengan 4 konsentrasi yaitu 200; 150; 100; 50 µg/ml sedangkan seri konsentrasi epirubicin 80; 60; 40; 20 nM/µL. Hasil perlakuan berupa viabilitas sel dan dikuantifikasi menggunakan metode perhitungan CI. Hasil uji kombinasi EEKBBP dan epirubicin menunjukan sinergisitas dengan nilai CI optimum yang diperoleh pada kombinasi EEKBBP 200 µg/mL dan epirubicin 20 nM/µL dengan nilai CI terendah 0.42 (Gambar 2).

Berdasarkan nilai IC yang diperoleh (Tabel 2) efek kombinasi yang paling baik yaitu efek sinergis yang didapatkan dari kombinasi 100 µg/mL EEKBBP + 20 nM/µL; 150 µg/mL EEKBBP + 20 nM/µL, 200 µg/mL EEKBBP + 20 nM/µL, kemudian kombinasi yang menghasilkan efek sinergis ringan-sedang yaitu 150 µg/mL EEKBBP + 40 nM/µL; dan 200 µg/mL EEKBBP + 40 nM/µL. Nilai CI dari kombinasi ekstrak etanol kulit batang beringin pencekik dan epirubicin dengan berbagai variasi konsentrasi menimbulkan 50 % efek antagonis (CI: 1,45-3,3), Efek sinergis 12,5 % (CI: 0,3-0,7), efek sinergis-ringan sedang 12,5 (CI: 12,5%), Efek sinergis (CI: 18,75%), dan efek efek antagonis ringan-sedang 12,5% (CI: 1,1-1,45).

Pengujian *doubling time* bertujuan untuk mengetahui waktu yang dibutuhkan sel kanker untuk membelah menjadi dua kali lipatnya. Perlakuan terhadap sel T47D diharapkan mampu menghambat waktu proliferasi dari sel tersebut (bersifat antiproliferatif). Dari hasil gambar 3 dapat disimpulkan bahwa proliferasi sel T47D menurun dari waktu ke 0 hingga waktu ke 42 jam walaupun ada beberapa konsentrasi tung dari ekstrak etanol kulit batang beringin pencekik dan epirubicin yang menurun pada jam ke 24 kemudian mengalami proliferasi kembali pada jam ke 48. Pada perlakuan kombinasi epirubicin dan ekstrak etanol kulit batang beringin pencekik penghambatan pertumbuhan sel terlihat lebih baik dibandingkan dengan pemberian tunggal (Gambar 3).

KESIMPULAN

EEKBBP memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker T47D, kemudian hasil uji kombinasi dengan epirubicin menunjukkan sinergisitas dengan nilai CI optimum yang diperoleh pada

kombinasi EEKBBP 200 µg/mL (½ IC_{50}) dan epirubicin 20 nM/µL (1/8 IC_{50}) dengan nilai CI 0.42. Hasil uji proliferasi pada perlakuan kombinasi EEKBBP dan EPI menunjukan sifat antiproliferatif yang lebih baik dibandingkan dengan perlakuan tunggal.

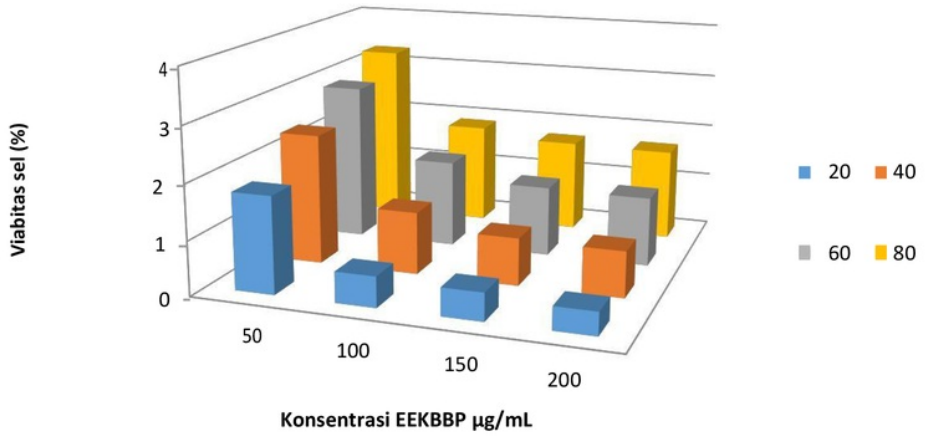
Tabel dan Gambar

Tabel 1. Hasil uji senyawa metabolit sekunder ekstrak EEKBBP menggunakan pereaksi warna

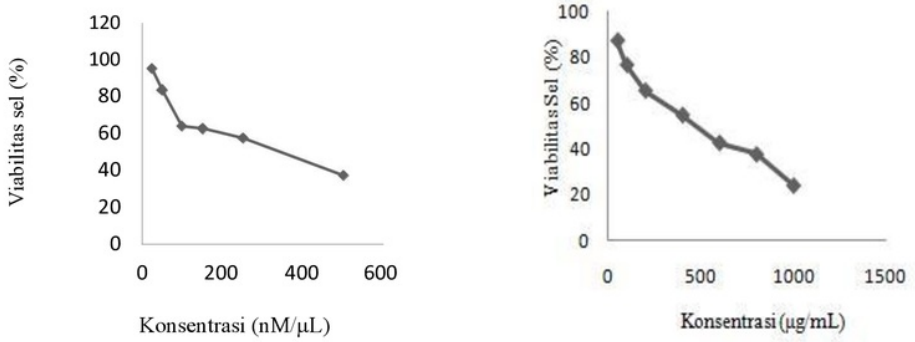
Uji Fitokimia	Hasil	Kesimpulan
Saponin	Larutanuji+aquadest, dikocok selama 30 detik terbentuk busa yangmantap	(+)
Flavoniod	Larutan uji + etanol (95%), saring filtrat + serbuk seng + HCL 2N + HCL(p) terbentuk warna jingga	(+)
Triterpenoid	Larutan uji diuapkan + asam asetat anhidrat + kl + asam sulfat pekat terbentuk cincin kecoklatan pada perbatasann larutan	(+)
Alkaloid	Larutan uji + pereaksi mayer tebentuk endapan putih	(+)
	Larutan uji + pereaksi wagner terbentuk endapan merah kecoklatan	(+)

Tabel 2. Nilai Combination Index (CI) dari kombinasi EPI dan EKBBP

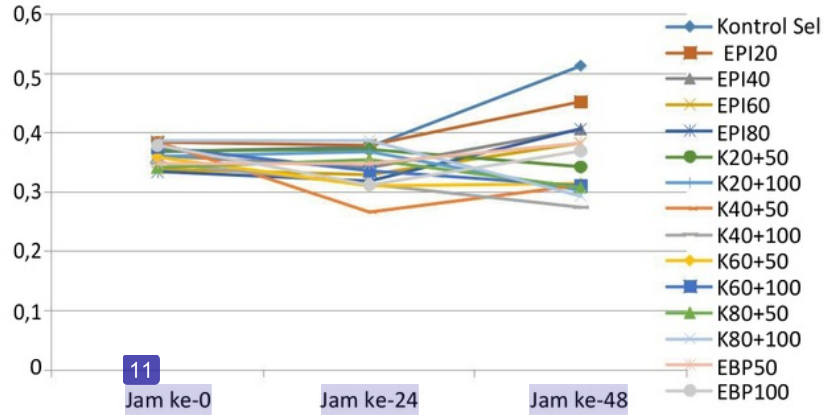
Konsentrasi	Konsentrasi Epirubicin (nM/µL)			
EEKBBP 20 40 60 80 (µg/mL)				
50	1,77	2,39	2,89	3,29
100	0,56	1,14	1,60	1,87
150	0,50	0,87	1,28	1,70
200	0,42	0,84	1,26	1.,68



Gambar 1.Grafik presentasi konsentrasi vs persentase kehidupan sel (viabilitas sel) antara EPI (a) dan EEKBBP (b)



Gambar 2. Grafik viabilitas sel T47D pada perlakuan kombinasi EEKBBP dan EPI terhadap sel kanker payudara T47D



Gambar 3. Grafik penghambatan laju proliferasi sel kanker payudara T47D yang diberi perlakuan EEKBBP dan EPI tunggal serta kombinasi

Efek Sitotoksik dan Penghambatan Kinetika Proliferasi Ekstrak Etanol Kulit Batang Beringin Pencekik (Ficus annulata,Bl) dan Epirubicin Sebagai Agen Ko-Kemoterapi Terhadap Sel Kanker Payudara T47D

ORIGINALITY REPORT

23%

SIMILARITY INDEX

PRIMARY SOURCES

1	repositori.uin-alauddin.ac.id Internet	81 words —	3%
2	repository.uin-malang.ac.id Internet	72 words —	3%
3	repository.usu.ac.id Internet	55 words —	2%
4	vdocuments.site Internet	35 words —	1%
5	artikel.dikti.go.id Internet	22 words —	1%
6	ojs.unud.ac.id Internet	22 words —	1%
7	eprints.undip.ac.id Internet	22 words —	1%
8	docslide.us Internet	21 words —	1%
9	diklatojs.pusbindiklat.lipi.go.id Internet	20 words —	1%
10	id.portalgaruda.org Internet		

		20 words — 1%
11	vdocuments.mx Internet	18 words — 1%
12	eprints.ums.ac.id Internet	18 words — 1%
13	psr.ui.ac.id Internet	17 words — 1%
14	kimia-teknologi.blogspot.com Internet	15 words — 1%
15	biodiversitas.mipa.uns.ac.id Internet	13 words — 1%
16	repositori.usu.ac.id Internet	12 words — 1%
17	rumah-tasikmalaya.blogspot.com Internet	11 words — < 1%
18	eprints.umm.ac.id Internet	10 words — < 1%
19	www.scribd.com Internet	10 words — < 1%
20	journal.unpad.ac.id Internet	9 words — < 1%
21	www.gerbangpertanian.com Internet	9 words — < 1%
22	repository.unhas.ac.id Internet	9 words — < 1%
23	eprints.uns.ac.id Internet	8 words — < 1%

24	es.scribd.com Internet	8 words — < 1%
25	pt.scribd.com Internet	8 words — < 1%

EXCLUDE QUOTES	OFF	EXCLUDE MATCHES	OFF
EXCLUDE BIBLIOGRAPHY	OFF		