

UJI AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL 50% UMBI KELADI TIKUS (*TYPHONIUM FLAGELLIFORME* (LOOD) BI) TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA MCF-7 IN VITRO

Lucie Widowati*, Harfia Mudahar**

Abstrak

Keladi tikus root (Typhonium flagelliforme (Lodd) BI) is one of plants that is used for cancer healing. The plant contents flavonoid, tannin, terpenoid and steroid. Flavonoid and terpenoid compound groups are known for anti cancer activities. The investigation is conducted to test cytotoxic effect of ethanol free dry extract of keladi tikus root (Typhonium flagelliforme (Lood)BI) against breast cancer cell MCF-7. Maceration extraction method used 50% ethanol solvent and vaporized until ethanol free dry extract of keladi tikus root was obtained. The test used 5 level of concentration, those were 50, 75, 100, 125 and 150 µg/ml with 3 times iteration. DMSO was used as negative control and Cisplatin with concentration of 4, 6, 8, 19, 12 µg/ml were used as positive control. Test result showed ethanol free dry extract of keladi tikus root has value of $LC_{50} = 89,15$ and Cisplatin has value of $LC_{50} = 7,84$ µg/ml. Further investigation of advance sitotoxic test value LC_{50} and value LC_{50} against fraction of 50% ethanol extract is necessary to obtain active compound against breast cancer cell MCF-7.

Keywords: Ethanol Extract 50% of keladi tikus root (Typhonium flagelliforme (Lood) BI), Breast Cancer, MCF-7 Cell, LC_{50} .

Pendahuluan

Pada dekade terakhir abad 20 ini, kanker merupakan salah satu penyakit yang ditakuti oleh manusia pada saat ini. Hal ini seiring dengan terjadinya perubahan gaya hidup seperti makin membudayanya kebiasaan merokok, mengkonsumsi makanan yang mengandung bahan karsinogenik seperti *fast food*, bahan pengawet serta zat warna, dan mengkonsumsi makanan tinggi lemak; peningkatan pencemaran akibat industrialisasi dan urbanisasi; dan perubahan lingkungan berupa penipisan lapisan ozon.

Kanker payudara atau karsinoma payudara merupakan jenis kanker yang paling sering diderita wanita dan merupakan penyebab kematian tertinggi pada wanita di seluruh dunia.¹

Di Indonesia kanker payudara berada di urutan kedua yang paling sering ditemukan pada wanita, setelah kanker mulut rahim. Penelitian di *Jakarta Breast Center* pada april 2001 sampai dengan 2003 menunjukkan bahwa dari 2.834 orang yang memeriksakan benjolan di payudaranya 364 orang (13%) didiagnosis kanker payudara.²

Pengobatan kanker seperti pemberian obat antikanker dan operasi tergolong sangat mahal. Selain itu, tidak jarang pasien tidak berhasil lepas dari cengkaman kanker meskipun sudah melakukan berbagai usaha pengobatan medis. Biasanya ditengah-tengah keputusan itu muncul secercah harapan baru, yakni beralih ke pengobatan tradisional.³

* Puslitbang Biomedis dan Farmasi, Balitbangkes Depkes RI

** Fakultas Farmasi Universitas Tujuh Belas Agustus

Salah satu tanaman yang dikenal untuk mengobati kanker diantaranya penyakit kanker payudara dan kanker rahim, adalah keladi tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lodd) BI).^{4,5} Tanaman ini banyak tumbuh di Indonesia dan Malaysia dan dikenal untuk mengobati beberapa penyakit seperti ambeien, sakit kulit, kanker efek samping kemoterapi dan juga netralisasi racun narkoba.^{6,7} Beberapa pengobat tradisional ramuan menggunakan tanaman ini untuk mengobati kanker.⁷

Kandungan senyawa tanaman ini belum banyak diketahui. Dari uji sebelumnya, diketahui bahwa ekstrak etanol umbi keladi tikus mengandung senyawa flavonoid, tanin, terpenoid dan sterol.⁸ Senyawa-senyawa golongan flavonoid dan terpenoid mempunyai aktivitas antikanker.⁹

Sel *MCF-7* adalah sel yang umum digunakan untuk menguji efek kanker payudara secara *in vitro* karena bentuknya terbaik dari semua jenis sel kanker payudara manusia. Sel *MCF-7* merupakan sel yang menyerupai sel epitel yang tumbuh secara *monolayer* dan diambil dari tempat efusi pleural metastasis kanker payudara pada penderita kanker payudara. Biakan sel *MCF-7* memiliki beberapa karakteristik pada epitel mamari yang berbeda termasuk dalam kemampuannya untuk memproduksi estradiol via reseptor sitoplasma dan kesanggupannya untuk membentuk *dome*. Dalam pertumbuhannya, sel ini akan membentuk kultur selapis pada labu kultur dan ditumbuhkan dalam medium DMEM.¹⁰

Penelitian bertujuan untuk mengetahui aktifitas sitotoksik ekstrak umbi keladi tikus pada sel kanker payudara, *MCF-7*.

Metode Penelitian

Bahan

Bahan yang digunakan terdiri dari:

1. Bahan tanaman yang digunakan adalah umbi keladi tikus yang dikumpulkan dari hasil budidaya di daerah Batu Tulis, Bogor, tahun 2005. Tanaman dideterminasi di Herbarium Bogoriense, Bidang Botani, Pusat Penelitian Biologi – LIPI Bogor.
2. Sel kanker payudara manusia *MCF-7*, *ATCC cell lines HTB 22* dari Institut Sains Biologi, Fakultas Biologi dan Sains Universitas Malaya, merupakan koleksi dari Rumah Sakit Kanker Darmais.
3. Bahan pembanding yaitu Cisplatin

(Platosin®, Pharmachemie B.V) diperoleh dari Rumah Sakit Kanker Darmais.

4. Bahan kimia yaitu: etanol 96% teknis, Medium kultur DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Merck), Trypsin (Sigma), Phospat Buffer Saline (PBS, Gibco), Trypan blue (Merck), *Natural red*, Sodium Dodesil Sulfat (SDS), Dimetilsulfoksida (DMSO, Sigma)

Pembuatan Pereaksi¹¹

1. *Medium kultur DMEM*. Satu botol medium DMEM yang mengandung L-glutamin dan 20 mM HEPES (Flow Lab, Sydney, Australia) dilarutkan dengan 1 liter aquadest steril dan ditambah dengan 2 g/L NaHCO₃. Medium ini kemudian disaring menggunakan penyaring bakteri dengan diameter 0,2 µM. Medium yang steril ini dapat disimpan di dalam freezer sebagai stok 100% dan dapat digunakan hingga 2 bulan.
2. *Phospat Buffer Saline (PBS)*. Dinatrium hydrogen fosfat (Na₂HPO₄) 2,16 g tambahkan 0,20 g kalium dihidrogen fosfat (KH₂PO₄); 8,0 g natrium klorida (NaCl) dan 0,2 g kalium klorida (KCl), dilarutkan dalam aquadest setril hingga 1 liter. Stabilkan pada pH 7,2 dan kemudian disterilkan dengan autoklaf.
3. *Trypsin*. Trypsin ditimbang 0,250 g dan ditambahkan larutan PBS hingga 1 liter aduk sampai larut. Setelah itu saring dengan penyaring bakteri dan simpan pada suhu – 20°C.
4. *Trypan blue*. Trypan blue ditimbang 0,2 g kemudian ditambahkan 50 ml aquadest steril, aduk sampai larut
5. *Natural red*. *Natural red* 0,1 g dilarutkan dalam 5 ml etanol dan 5 ml aquadest steril. Setelah itu diambil 1 ml lalu diencerkan dengan 49 ml aquadest steril kemudian saring dengan penyaring bakteri.
6. *Sodium Dodesil Sulfat (SDS)*. SDS 1 g dilarutkan dalam 100 ml aquadest steril, aduk sampai larut.

Pembuatan Bahan Uji

- a. **Pembuatan ekstrak dan karakteristik ekstrak**

Bahan segar umbi keladi tikus (*Typhonium*

flagelliforme) yang telah dicuci, dirajang dan diekstraksi dengan cara maserasi 4 x 36 jam menggunakan pelarut etanol 50%. Ekstrak etanol yang diperoleh, disaring, dipekatkan dengan alat vakum *rotary evaporator* sampai didapatkan ekstrak kering yang bebas dari etanol, lalu dihitung rendemennya. Pada ekstrak kering bebas etanol tersebut, dilakukan pengujian karakter non-spesifik dengan metode Parameter Ekstrak.¹²

b. Pembuatan Sampel Uji.

Buat larutan induk dari ekstrak kering 10 mg dilarutkan dalam 1 ml DMSO. Kemudian dibuat pengenceran dengan medium DMEM sampai didapatkan beberapa konsentrasi yaitu: 50, 75, 100, 125 dan 150 µg/ml.

c. Pembuatan Larutan kontrol positif

Buat larutan induk dari Cisplatin 1 mg dilarutkan dalam 1 ml DMSO. Kemudian dibuat pengenceran dengan medium DMEM sampai didapatkan konsentrasi 4, 6, 8, 10, 12 µg/ml.

Uji Bioesei Sitotoksik

Pengujian dilakukan pada plat dengan 96 sumuran. Masukkan 250 µl suspensi sel *MCF-7* ke dalam masing-masing sumuran. Sel dalam sumuran diinkubasi di inkubator CO₂ pada suhu 37°C selama 20-48 jam, dan diamati kepadatannya dengan alat *hemacytometer*. Setelah itu, masukkan 100 µl larutan uji ke dalam masing-masing sumuran dengan konsentrasi 50, 75, 100, 125, dan 150 µg/ml, 100 µl pelarut DMSO dimasukkan sebagai kontrol negatif. Inkubasi selama 24 jam, dan tambahkan 100 µl *natural red* pada setiap sumuran, maka sel hidup akan diwarnai oleh *natural red*. Zat warna yang dapat memasuki sel hidup akan terakumulasi dalam lisosom. Proses pewarnaan sel dengan *natural red* membutuhkan waktu inkubasi 2 jam, maka lakukan inkubasi lanjut pada inkubator CO₂ pada suhu 37°C selama 2 jam. Sel kemudian dicuci dengan PBS untuk membuang *natural red* yang tidak mewarnai sel dan membuang sel mati yang sudah tidak melekat pada dasar sumur. Sel kemudian ditambahkan larutan SDS 1% diinkubasi selama 30 menit dengan tujuan untuk melisiskan sel sehingga *natural red* yang telah terikat pada sel akan keluar. *Natural red* yang telah dikeluarkan dari dalam sel diukur serapannya dengan *ELISA Plate*

Reader pada panjang gelombang 495 nm dan 630 nm. Serapan berbanding lurus dengan sel hidup.

Persentase kematian sel untuk setiap konsentrasi dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ kematian sel} = \frac{\text{serapan kontrol negatif} - \text{serapan sample uji}}{\text{serapan kontrol negatif}} \times 100\%$$

Hubungan kematian sel dan konsentrasi selanjutnya dianalisa dengan menggunakan uji regresi linier.

Hasil dan Pembahasan

Ekstrak yang dihasilkan merupakan ekstrak kering berwarna coklat keputihan dan didapatkan rendemen 0,64%.

Dari uji parameter non-spesifik ekstrak etanol keladi tikus didapat data

1. Susut Pengerinan : 6,5 %
2. Kadar air : 6,5 %
3. Kadar abu total : 7,1%
4. Kadar sari larut dalam air : 0,98%
5. Kadar sari larut dalam etanol: 0,71%
6. Penetapan sisa pelarut : negatif

Hasil pengujian Yasmin⁸ berupa pemeriksaan pendahuluan fitokimia umbi keladi tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lood) Bl) diketahui bahwa tumbuhan ini mengandung flavanoid, fenol, saponin, dan sterol/triterpenoid, dan sesuai berdasarkan literatur diketahui senyawa alkaloid, flavonoid dan terpenoid dapat mempunyai aktifitas sebagai sitotoksik.⁹

Pengujian sitotoksitas secara *in vitro* dilakukan sebagai langkah awal dalam penapisan senyawa-senyawa yang berpotensi sebagai antikanker. Pengujian secara *in vitro* menggunakan biakan sel (*cell line*) memberikan kelebihan dibandingkan pengujian secara *in vivo* yaitu bahan uji yang dibutuhkan lebih sedikit dan waktu pengujian relatif lebih singkat.

Sel kanker payudara yaitu sel *MCF-7* dikultur dalam medium DMEM sesuai dengan spesifikasi sel. Medium ini membutuhkan karbon-dioksida 5% dalam fase gasnya untuk mempertahankan kerja dapar bikarbonat HEPES sehingga dicapai pH optimal bagi pertumbuhan.¹¹ Ekstrak dilarutkan dengan pelarut DMSO karena DMSO merupakan pelarut yang dapat digunakan untuk

melarutkan sebagian ekstrak yang tidak dapat larut dalam air dan pada konsentrasi di bawah 3% biasanya DMSO tidak toksik kepada sel.

Kepadatan sel *MCF-7* dihitung dengan menggunakan *hemacytometer* karena cara tersebut mudah, murah dan memberikan kesempatan untuk melihat langsung apa yang kita hitung. Sel ditambahkan *trypan blue*, sehingga pada saat yang bersamaan sel hidup dan sel mati dapat dibedakan secara visual dan dihitung. Sel hidup dengan membran yang utuh mampu mengeksklusi *trypan blue* sehingga sel hidup tidak berwarna. Sel yang mengalami kerusakan membran akan mengambil zat warna dan sel akan berwarna biru.

Setelah penambahan larutan sampel uji dan kontrol negatif ke dalam plate 96 sumuran yang berisi sel *MCF-7*, dilakukan inkubasi selama 24 jam. Selanjutnya ditambahkan zat warna *natural red*, maka sel hidup akan diwarnai oleh *natural red*. Zat warna yang dapat memasuki sel hidup akan terakumulasi dalam lisosom. Proses pewarnaan sel dengan *natural red* membutuhkan waktu inkubasi 2 jam. Sel kemudian dicuci dengan PBS untuk membuang *natural red* yang tidak mewarnai sel dan membuang sel mati yang

sudah tidak melekat pada dasar sumur. Sel kemudian ditambahkan larutan SDS 1% diinkubasi selama 30 menit dengan tujuan untuk melisis sel sehingga *natural red* yang telah terikat pada sel akan keluar. *Natural red* yang telah dikeluarkan dari dalam sel diukur serapannya dengan *ELISA Plate Reader* pada panjang gelombang 495 nm dan 630 nm. Serapan berbanding lurus dengan sel hidup.

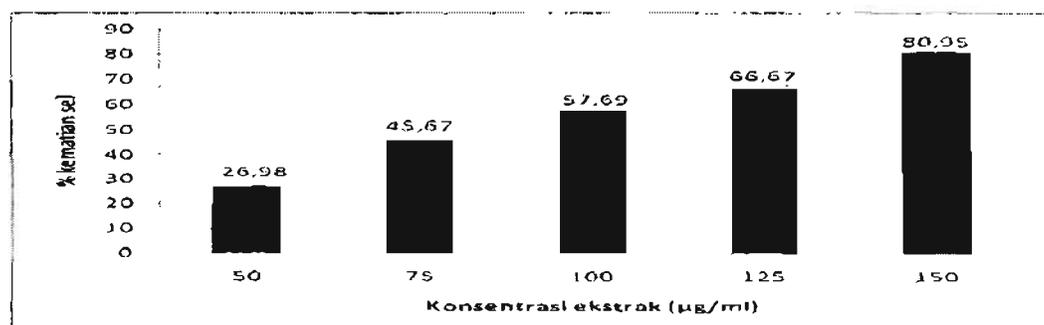
Pengujian sitotoksik dengan *natural red* yang dilakukan terhadap sel *MCF-7* dengan pemberian ekstrak etanol 50% umbi keladi tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lood) BI) pada konsentrasi yang berbeda ditunjukkan pada tabel 1.

Berdasarkan data pada tabel 1, dihitung secara statistik regresi linier dan diperoleh persamaan regresi linier yaitu $y = 4,016 + 0,51576x$, di mana y adalah konsentrasi ekstrak keladi tikus dan x adalah nilai serapan. Dari persamaan tersebut dapat dihitung LC_{50} sebesar 89,16 $\mu\text{g/ml}$. Berdasarkan hasil perhitungan statistik diperoleh juga nilai koefisien korelasi sebesar 0,993. Hal ini menunjukkan adanya hubungan yang erat antara persentase kematian sel dengan konsentrasi ekstrak.

Tabel 1. Data Serapan dan Kematian Sel *MCF-7* yang Diinkubasi dengan Ekstrak Etanol 50% Umbi Keladi Tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lood) BI) Setelah 24 jam

No	Konsentrasi Ekstrak keladi tikus ($\mu\text{g/ml}$)	Serapan		Persentase kematian sel
		kontrol (-)	Ekstrak keladi tikus	
1	50	0,021	0,015	26,98
2	75	0,024	0,013	45,67
3	100	0,026	0,011	57,69
4	150	0,027	0,009	66,67
5	200	0,035	0,007	80,95

Ket : Kontrol (-) = Sel + DMEM



Gambar 1. Diagram Hubungan Antara Konsentrasi Ekstrak Keladi Tikus dengan Persentase Kematian Sel *MCF-7* Setelah Inkubasi 24 jam

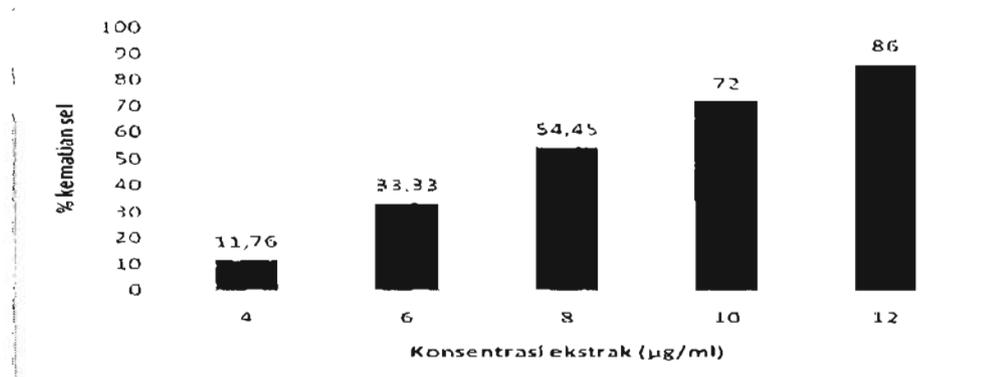
Sebagai kontrol positif digunakan Cisplatin, karena Cisplatin merupakan obat pilihan untuk penyakit kanker.¹³ Dengan cara yang sama, dilakukan pengukuran serapan terhadap Cisplatin, untuk mendapatkan harga LC_{50} , dapat dilihat pada tabel 2.

Berdasarkan data pada tabel 2, dihitung secara statistik regresi linier dan diperoleh persamaan regresi linier yaitu $y = 9,3575 - 23,352 x$. Dari persamaan tersebut dapat dihitung LC_{50} sebesar 7,84 $\mu\text{g/ml}$.

Tabel 2. Data Serapan dan Persentase Kematian Sel MCF-7 yang Diinkubasi dengan Cisplatin Setelah 24 jam

No.	Konsentrasi Cisplatin ($\mu\text{g/ml}$)	Serapan		Persentase kematian sel
		Kontrol (-)	Cisplatin	
1	4	0,017	0,015	11,76
2	6	0,018	0,012	33,33
3	8	0,022	0,010	54,45
4	10	0,025	0,007	72,00
5	12	0,029	0,004	86,00

Ket : Kontrol (-) = Sel + DMEM



Gambar 2. Diagram Hubungan Antara Konsentrasi Cisplatin dengan Persentase Kematian sel MCF-7 Setelah Inkubasi 24 jam

Tabel 3. Perbandingan Persentase Kematian (%) antara Ekstrak Etanol 50% Umbi Keladi Tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lood) BI) dengan Cisplatin

No.	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)		Persentase Kematian Sel		LC_{50}	
	Sampel Uji	Kontrol (+)	Sampel Uji	Kontrol (+)	Sampel Uji	Kontrol (+)
1	50	4	26,98	11,76		
2	75	6	45,67	33,33		
3	100	8	57,69	54,45	89,16	7,84
4	125	10	66,67	72,00		
5	150	12	80,95	86,00		

Ket: Sampel uji = Ekstrak etanol 50% umbi keladi tikus

Kontrol (+) = Cisplatin

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa sel yang diberi ekstrak etanol 50% umbi keladi tikus setelah diinkubasi selama 24 jam dapat menghambat proliferasi sel pada konsentrasi 50, 75, 100, 125, dan 150 µg/ml. Semakin tinggi konsentrasi yang digunakan semakin kecil jumlah sel yang hidup dan aktifitas penghambatannya (persentase kematian) makin tinggi. Data persentase kematian sel setelah dihitung dengan statistik regresi linier, pada konsentrasi 89,16 µg/ml ekstrak etanol 50% umbi keladi tikus dapat menghambat 50% proliferasi sel (LC_{50}) MCF-7, dan Cisplatin dapat menghambat 50% proliferasi sel (LC_{50}) MCF-7 pada konsentrasi 7,84 µg/ml. Potensi ekstrak kering keladi tikus dibandingkan Cisplatin dalam mematikan 50 % sel kanker adalah 1 : 11,4.

Aryati,¹⁴ melakukan fraksinasi ekstrak daun keladi tikus dengan pelarut air, n-butanol dan etil asetat dan menguji khasiatnya terhadap sel HeLa Ohio (sel kanker serviks). Dari fraksi etil asetat diperoleh senyawa terpen, yang aktif terhadap sel HeLa Ohio dengan LC_{50} 7,2 ppm. Nilai ini sebanding dengan nilai LC_{50} Cisplatin. Suatu zat dapat dikatakan mempunyai sifat sitotoksik yang kuat, bila dapat mematikan sel kanker pada konsentrasi dibawah 20 µg/ml, dan semakin kecil nilai LC_{50} , potensi sebagai antikanker makin baik. Karena itu, perlu penelitian lebih lanjut terhadap fraksi aktif dari ekstrak etanol, untuk kanker payudara.

Kesimpulan dan Saran

Ekstrak etanol 50% umbi keladi tikus dapat menghambat 50 % pertumbuhan sel kanker payudara (sel MCF-7) pada konsentrasi 89,16 µg/ml. Mempunyai perbandingan potensi terhadap Cisplatin sebesar 1 berbanding 11,4 kali. Disarankan melakukan penelitian lanjut untuk konfirmasi aktivitas antikanker terhadap isolasi fraksi aktif dari ekstrak etanol untuk mendapatkan senyawa aktif sebagai antikanker payudara.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terimakasih disampaikan pada Badan Litbangkes, penelitian ini menggunakan dana RISBINKES tahun 2005 dan kepada yang terhormat, Ibu Dra. Wan Lelly MS. dan Debi Sinta Dewi, SSi. Apt. di RS Kanker Darmas.

Daftar Pustaka

1. WHO. *National Cancer Control Programmes*. WHO Geneve 2003 ;3: 3-7, 11-18, 68-77.
2. Burstein HJ, Winer EP. *Primary Care of Survivors of Breast Cancer*. US Departement of Health and Human Services, Bethesda, USA, 2000. <http://www.Cancer.gov>. Akses 10 Feb 2002.
3. Piverm, M., H. Ronald, Kevin. *Neoplasm of the Cerviks* dalam Holland, James F, editors. *Cancer Medline*, 3rd ed, Lea & Febiger, London, 1993: 1631-1632.
4. Heyne. *Tumbuhan berguna Indonesia*. Badan Litbang Kehutanan, Jakarta, 1987: 1.
5. Chee Yan Choo . *The Cytotoxicity and chemical constituents of the hexane fraction of Typhonium flagelliforme (Araceae)*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2001.
6. ESSAI. *Medicinal Herbs Index in Indonesia*. PT Essai Indonesia, Jakarta. 1986: 428
7. Dalimarta. *Ramuan Tradisional untuk Pengobatan Kanker*. Penebar Swadaya, Jakarta, 2003: 1-14.
8. Yasmin A., Mudahar H. *Penapisan Fitokimia, KLT, Serta Uji Toksisitas Ekstrak Etanol 70% Umbi Keladi Tikus Dengan Metode BSLT*. Laporan Penelitian , Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 2005.
9. Cutler, Stephen J., Cutler H. *Biologically Active Natural Products*, Pharmaceuticals. CRC Press LLC. Boca Raton. USA , 2000: 1 - 13, 17 - 22, 73 - 92.
10. Anonim. *Kanker payudara*. Jakarta, 2004: 1-8. <http://www.Medicastrore.com>, Akses 16 Januari 2008.
11. Freshney, I. *Culture of animal Cells* dalam *A Manual of Basic Technique*, 3rd ed., Wiley-Liss Inc., New York, 1994: 85-88, 154-155, 260-287.
12. Anonim. *Parameter Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Edisi I, Departemen Kesehatan RI, 2000.
13. Nafrialdi & Sulistia. *Antikanker* dalam *Farmakologi & Terapi*, ed. Ke-5, Balai Penerbit FKUI, Jakarta, 1995: 686-701.
14. Aryanti. *Isolasi Senyawa Antikanker dari Tanaman Keladi Tikus (Typhonium divaricatum L. Decne)*, *Jurnal Bahan Alam Indonesia*, 2004:3 (2)