

CYTOTOXIC TEST OF PERIWINKLE LEAVES EXTRACT (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) TOWARDS RAJI CELLS (IN VITRO)

UJI SITOTOKSISITAS EKSTRAK DAUN TAPAK DARA (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) TERHADAP SEL RAJI (KAJIAN IN VITRO)

Bahtiar Afandi¹, Ana Medawati²
Mahasiswa PSPDG FKIK UMY¹, Dosen PSPDG FKIK UMY²

ABSTRACT

Background : Cancer is a disease with high number of mortality that happens when the body cells are uncontrollable dividing and affect other tissues. Raji cells is a cancer cells that comes from head and neck cancer which is *Burkitt's lymphoma* as one of the cancers that often be found in developing countries. Conventional cancer therapies such as chemotherapy or radiation are causing negative side effects in patient's body; hence, cancer therapies with minimum side effects using herbs are still needed. Periwinkle (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) contains several alkaloids such as vincristine, vinblastine, catharantine, leurosidine and leurosine which is an anticancer component. The purpose of this study is to discover the potency of ethanolic extract of periwinkle leaves in a different concentrations which were 0 µg/ml, 1,56 µg/ml, 3,125 µg/ml, 6,25 µg/ml, 12,5 µg/ml, dan 25 µg/ml towards raji cells using cytotoxic test.

Method : The method was a pure in vitro laboratory experiment including periwinkle leaves extract (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) production with maceration method, raji cells preparation, cytotoxic test using MTT assay (*Microculture Tetrazolium Salt*), absorbencies reading using ELISA reader with 550 nm wavelength, and percentage of cell death counting. The sample of this study is a cultured raji cells that were breed in RPMI 1640 media that was given by 10% of *Foetal Bovine Serum* (FBS).

Result : The highest potency of periwinkle leaves extract (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) on destroying raji cells is 6,25 µg/ml with cell destroyed was 40,3%. Regression test shows that the extract of periwinkle leaves (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) has an IC₅₀ in the amount of 52,84 µg/ml towards raji cells. The conclusion of this study is periwinkle leaves extract (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) has a high cytotoxicity level.

Keywords: *Catharanthus roseus* [L.] G. Don, *Alkaloids*, anticancer, raji cells, cytotoxicity, apoptosis, herbal therapy

INTISARI

Latar belakang : Kanker merupakan suatu penyakit dengan angka kematian yang tinggi yang terjadi ketika sel-sel dalam tubuh membelah tanpa kontrol dan dapat menyerang jaringan lainnya. Kanker Sel raji merupakan sel kanker yang berasal dari kanker kepala dan leher, yaitu kanker *Burkitt's lymphomadan* merupakan salah satu jenis kanker yang cukup sering ditemui di negara-negara berkembang.

Pengobatan kanker konvensional seperti kemoterapi atau radiasi pada umumnya dapat menimbulkan efek samping negatif terhadap tubuh penderita, oleh karena itu diperlukan pengobatan kanker dengan efek samping yang minimal yaitu dengan pengobatan herbal. Tapak dara (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) mengandung senyawa alkaloid seperti *vincristine*, *vinblastine*, *katarantine*, *leurosidine* dan *leurosine* yang merupakan senyawa anti kanker.

Tujuan Penelitian : Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi aktivitas sitotoksik dari ekstrak etanolik daun tapak dara (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) terhadap sel kanker raji dengan menggunakan uji sitotoksik dalam berbagai konsentrasi 0 µg/ml, 1,56 µg/ml, 3,125 µg/ml, 6,25 µg/ml, 12,5 µg/ml, dan 25 µg/ml.

Metode : Penelitian ini menggunakan metode laboratoris murni *in vitro*, meliputi pembuatan ekstrak daun tapak dara (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) dengan cara maserasi, pembiakan sel kanker raji, uji sitotoksik sel dengan menggunakan metode MTT (*Microculture Tetrazolium Salt*), pembacaan absorbansi dengan menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 550 nm, dan perhitungan persentase kematian sel. Sampel penelitian ini menggunakan kultur sel kanker raji yang dibiakkan dalam media RPMI 1640 yang diberi *Foetal Bovine Serum* (FBS) 10%.

Hasil : Potensi aktivitas sitotoksik tanaman tapak dara (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) tertinggi pada konsentrasi 6,25 µg/ml yang mampu membunuh sel raji sebesar 40,3%. Uji regresi yang telah dilakukan menunjukkan bahwa tanaman tapak dara (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) memiliki kadar IC₅₀ sebesar 52,84 µg/ml terhadap sel kanker raji.

Kesimpulan : Dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) memiliki potensi aktivitas sitotoksitas yang tinggi.

Kata kunci : *Catharanthus roseus* [L.] G. Don, *Alkaloids*, antikanker, sel kanker raji, sitotoksitas, pengobatan herbal

PENDAHULUAN

Kanker atau tumor ganas adalah pertumbuhan sel/jaringan yang tidak terkendali, terus bertumbuh/ bertambah, *immortal* (tidak dapat mati). Sel kanker dapat menyusup ke jaringan sekitar dan dapat membentuk anak sebar. Tahun 2008, terdapat 12,7 juta kasus kanker dan 7,6 juta kematian di dunia yang terjadi akibat kanker¹. Penderita kanker di Indonesia telah mencapai angka 1,4 per mil, dengan angka kejadian terbesar ada pada kota Yogyakarta sebanyak 4,1 per mil².

Kanker raji merupakan salah satu sel kanker kepala dan leher yang berasal dari kanker burkit *lymphoma* dan pada dasarnya merupakan sel *hematopoietic*, yang telah mendapatkan paparan dari *Eipstein-bars Virus*. Angka insidensi kasus kanker raji di Asia cukup tinggi, dengan rata-rata kasus 13%-20% dari total kasus kanker secara umum dan 50% dari total kasus kanker kepala dan leher³. Hal lain yang menyebabkan besarnya angka kematian

akibat kanker adalah belum adanya pengobatan yang mampu menghambat pertumbuhan kanker secara menyeluruh.

Secara garis besar, pengobatan kanker merupakan tindakan pengobatan konvensional yang meliputi tindakan pembedahan, penyinaran (radioterapi), peningkatan daya tahan tubuh (imunoterapi). Pengobatan herbal merupakan salah satu pengobatan alternatif yang dapat digunakan sebagai pendamping dari pengobatan konvensional dan dapat mengurangi efek negatif dari pengobatan kanker itu sendiri. Penggunaan herbal sendiri memiliki beberapa keuntungan, salah satunya adalah obat herbal memiliki efek samping yang kecil apabila dikonsumsi dengan dosis yang tepat⁴. Salah satu agen antikanker yang dapat dijadikan sebagai alternatif terapi adalah senyawa alkaloid seperti *Vinblastine*, *Vincristine*, *Anhydro-vinblastine*, serta alkaloid jenis lain yang dapat ditemukan pada beberapa tumbuhan di Indonesia, salah

satunya adalah tanaman tapak dara (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don).

Tapak dara (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) umumnya dikenal dalam pengobatan tradisional dalam menurunkan kadar glukosa darah, namun pada pemeriksaan selanjutnya ternyata menunjukkan adanya aktivitas antikanker⁵. Hampir semua bagian dari tanaman tapak dara bermanfaat untuk kesehatan maupun pengobatan. Daunnya mengandung senyawa alkaloid yaitu vinkristin dan vinblastin⁶.

Untuk mengetahui aktivitas antikanker tapak dara (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) terhadap sel kanker raji, perlu dilakukan uji sitotoksik dari tanaman tapak dara (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don). Uji sitotoksitas merupakan pengujian yang dilakukan untuk mengetahui kemampuan suatu zat dalam mematikan suatu sel yang dinyatakan dalam nilai IC_{50} ⁷.

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji potensi aktivitas antikanker

tanaman tapak dara (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) yang dilakukan melalui uji sitotoksitas terhadap sel kanker raji. Pengujian sitotoksitas diharapkan dapat menggambarkan kemampuan tanaman tapak dara (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) dalam membunuh sel kanker, serta dapat menjadi acuan dalam melakukan pengujian lain dengan menggunakan tanaman yang sama.

BAHAN DAN METODE

Bahan untuk uji aktivitas sitotoksik tanaman tapak dara (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don)

Biakan sel kanker raji, Ekstrak etanol daun tapak dara, Media RPMI medium 1640, Foetal bovine serum (FBS), Phosphat buffer saline (PBS), Stop solution powder, Distiloid water, Larutan MTT Assay, Penisilin-streptomisin, Fungizon 1%, Aquadest, Etanol 85%.

Persiapan ekstrak etanol daun tapak dara (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don)

Daun tapak dara segar dicuci bersih kemudian dikeringkan dalam almari

pengering dengan suhu 45⁰C selama 48 jam.

Daun tapak dara yang telah kering kemudian dijadikan serbuk. Pembuatan ekstrak etanol dengan metode maserasi dengan cara merendam 300 g serbuk daun tapak dara menggunakan etanol 85% dan diaduk selama 30 menit, dan didiamkan selama 24 jam. Lakukan penyaringan menggunakan kertas saring sebanyak 2 kali, Kemudian diuapkan menggunakan *vacuumrotary evaporator* pemanas *waterbath* pada suhu 60⁰C, kemudian diencerkan menjadi beberapa konsentrasi, yaitu 1,56 µg/ml, 3,125 µg/ml, 6,25 µg/ml, 12,5 µg/ml, dan 25 µg/ml.

Persiapan biakan sel raji

Sel raji dibiakan dalam medium RPMI 1640 dengan FBS 10%. Kemudian inkubasikan sel pada suhu 37^o C dengan kelembaban udara 95% dan CO₂ 5%. Setelah dilakukan pemanenan sel, lakukan perhitungan sel yang dibutuhkan dengan menggunakan bilik hitung dan didapatkan hasil sel yang diperlukan adalah 1 x 10⁵ sel/well.

Uji sitotoksik metode MTT

Transferkan sel yang telah diencerkan dengan menggunakan medium ke dalam plat 96 sumuran, masing-masing 100 µl, usahakan sel tetap homogen dengan cara meresuspensi sel setiap kali mengisi 12 sumuran. Setelah didiamkan selama 1-2 jam tambahkan 100 µl ekstrak dengan konsentrasi 1,56 µg/ml, 3,125 µg/ml, 6,25 µg/ml, 12,5 µg/ml, dan 25 µg/ml dan untuk kontrol selnya adalah 0 µg/ml, kemudian inkubasikan dalam inkubator CO₂ selama 24 jam.

Amati dengan menggunakan mikroskop, setelah itu buang medium dengan cara dibalik pada kertas *tissue*. Tambahkan pada masing-masing well 100 µl MTT (5 mg MTT + 1 ml PBS+ 9 ml medium RPMI komplet/medium penumbuh) dan inkubasikan kembali selama 4-6 jam. Amati sel dengan menggunakan mikroskop *inverted*, jika *formazan* telah terbentuk, tambahkan *stop solution* SDS 10% dalam 0,1 HCL sebanyak

100 µl pada masing-masing *well*, setelah itu bungkus *plate* dengan menggunakan *aluminium foil* dan inkubasikan kembali sel selama satu malam, untuk inkubasi kali ini tidak menggunakan inkubator. Baca hasil uji sitotoksik menggunakan alat *ELISA reader* dengan panjang gelombang 550 nm.

Data diambil melalui pembacaan absorbansi dengan menggunakan *ELISA reader*, Kemudian data yang diperoleh akan dilakukan penghitungan jumlah kematian sel dengan menggunakan rumus :

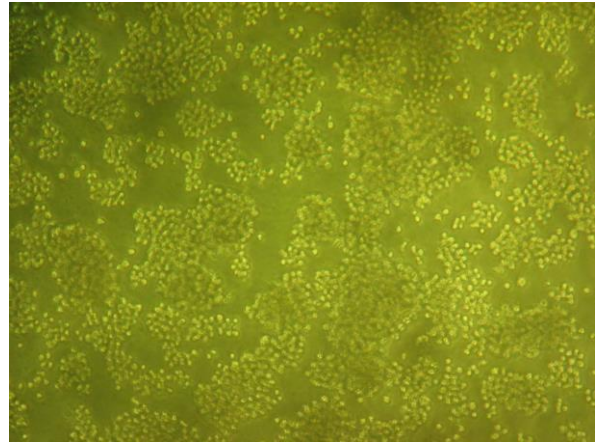
$$\% \text{ sel mati} = \frac{(\text{OD Kontrol} - \text{OD sampel}) \times 100 \%}{(\text{OD kontrol})}$$

$$\text{OD kontrol} = \text{kontrol sel} - \text{kontrol media}$$

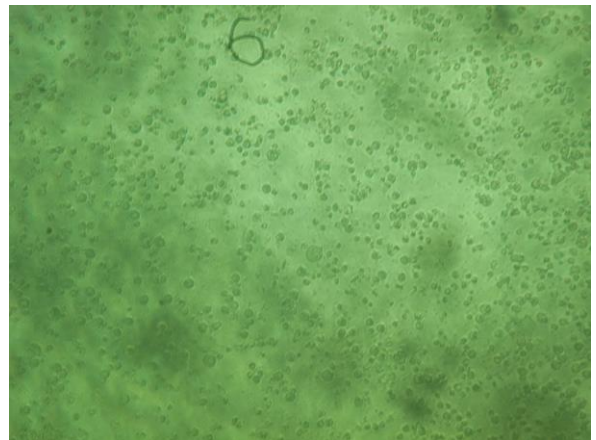
Dari hasil perhitungan tersebut, kemudian dilakukan uji regresi dengan menggunakan SPSS.

HASIL

Gambar 1. Sel kanker raji sebelum diberi perlakuan



Gambar 2. Sel kanker raji setelah diberi perlakuan



Dari gambar tersebut dapat ditemukan perbedaan yang cukup signifikan antara sel kanker raji sebelum diberi perlakuan dengan setelah diberi perlakuan. Terlihat bahwa pada gambar 1 sel kanker raji bergerombol dan melayang. Dengan gambaran sel membulat, berbeda dengan

gambar 2 dengan penampakan sel kanker raji yang mulai berkurang jumlahnya.

Setelah dilakukan pembacaan dengan menggunakan ELISA reader dilanjutkan dengan perhitungan persentase kematian sel dengan hasil sebagai berikut :

Tabel 1 Hasil perhitungan persentase kematian sel

konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Hambatan %
25	38,5
12,5	37,9
6,25	40,3
3,125	36,22
1,56	34,43
0,78	29,33

Dari tabel 1 tersebut dapat diketahui bahwa dari keenam konsentrasi ekstrak daun tapak dara (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) memiliki nilai persentase hambatan pertumbuhan sel kanker raji yang berbeda-beda, dimana pada konsentrasi 6,25 $\mu\text{g/ml}$ menunjukkan persentase hambatan sebesar 40,3%, persentase tersebut merupakan angka hambatan tertinggi, kemudian menurun pada angka 12,5 $\mu\text{g/ml}$.

Dari hasil perhitungan persentase kematian sel tersebut, dilanjutkan dengan uji regresi dengan menggunakan SPSS. Hasil uji statistik menggunakan uji regresi yang telah dilakukan dapat diketahui bahwa tanaman tapak dara memiliki nilai IC_{50} sebesar 52,084 $\mu\text{g/ml}$.

PEMBAHASAN

Hasil penelitian diketahui bahwa nilai IC_{50} sebesar 52,084 $\mu\text{g/ml}$. dalam penelitian lain menyebutkan bahwa tanaman tapak dara (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) memiliki potensi hambatan yang tinggi terhadap sitokrom CYP2D6, yang ditunjukkan dengan nilai IC_{50} sebesar 11 $\mu\text{g/ml}$ ⁸. Nilai IC_{50} dibawah 100 $\mu\text{g/ml}$ menunjukkan adanya potensi ekstrak uji sebagai agen kemoprevensi⁹. Nilai IC_{50} dapat diklasifikasikan sesuai kriteria berikut¹⁰:

Score 1 : *Weak* $\text{IC}_{50} \geq 50 \mu\text{g/ml}$

Score 2 : *Moderately Active* $10 \mu\text{g/ml} \leq \text{IC}_{50} \leq 50 \mu\text{g/ml}$

Score 3 : *Active* $\text{IC}_{50} \leq 10 \mu\text{g/ml}$

Besaran nilai IC_{50} dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu : 1. Metode dan jenis pelarut yang digunakan untuk pengekstrakan.
2. Spesies tapak dara dan tempat tumbuhnya.
3. Jenis sel yang digunakan untuk pengujian^{11,7}.

Faktor lain yang dapat mempengaruhi besaran nilai IC_{50} adalah adanya zat-zat penyerta lain yang terlarut dalam ekstrak selama proses pengujian. Dalam penelitian yang dilakukan oleh Jordan, Dkk., pada tahun 1985 menyebutkan bahwa tanaman tapak dara (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) memiliki zat aktif yang sangat beragam, salah satunya adalah alkaloid. Dalam penelitian tersebut juga menyebutkan bahwa aktivitas antikanker akan lebih efektif apabila dilakukan isolasi senyawa aktif¹².

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat ditarik kesimpulan bahwa Ekstrak etanol daun tapak dara (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) memiliki potensi aktivitas

sitotoksik terhadap sel kanker raji dengan nilai IC_{50} sebesar 52,084 $\mu\text{g/ml}$.

SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap sel kanker secara *in vitro* dan *in vivo*
2. Perlu dilakukan penelitian dengan isolasi senyawa aktif untuk mengetahui efektifitas yang lebih baik
3. Perlu dilakukan penelitian yang lebih spesifik dengan membandingkan aktivitas sitotoksik pada sel kanker raji dengan sel kanker *vero* sebagai control sel, untuk mengetahui ada atau tidaknya pengaruh ekstrak daun tapak dara (*Catharantus roseus*) terhadap sel normal.
4. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan ekstrak daun tapak dara (*Catharantus roseus*) terhadap sel kanker lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- 1) Jemal, Ahmedin; Bray, Freddie; Center, Melissa M.; Ferly, Jacques; Ward, Elizabeth; Forman, David, 2011. Global Cancer Statistic. *CA Cancer J Clin*, Volume 61, pp. 69-90.
- 2) Depkes, 2014. *Riset Kesehatan Dasar*, Jarakarta: Departemen kesehatan RI.
- 3) Zagars, a. Gunar K., 1993. Cancer of the Nasopharynx. In: P. Rubin, ed. *Clonical Oncology for Medical Student and Physicians*. Philadelphia: University of Rochester Cancer Center School of Medicine and Dentistry, pp. 345-346.
- 4) Mangan, Y., 2009. *Solusi Sehat Mencegah & Mengatasi Kanker*. 1 ed. Jakarta: AgroMedia Pustaka.
- 5) Lingga L, 2005. *Si Tapak Dara yang Menawan*. Jakarta: Penerbit Agromedia Pustaka.
- 6) De Padua, L.S., N. Bunyaphratsara dan R.H.M.J. Lemmens eds. 1999. Plant Resources of Southeast Asia No. 12 (1): Medicinal and Poisonous Plants 1, Bogor: Prosea & Leiden: Backhuys.
- 7) Freshney, R.I. (1992). *Animal Cell Culture*. New York : Oxford University
- 8) Usia, T., Watabe T., Kadota S., Tezuka Y., 2005. Cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) Inhibitory Constituents of *Catharanthus roseus*. *Biology Pharmacy*, volume 28, pp. 1021-1024
- 9) Meiyanto, E., Susidarti, R.A., Handayani, S., Rahmi, F. 2008. Ekstrak Etanolik Biji Buah Pinang (*Areca catechu* L.) mampu menghambat proliferasi dan memacu apoptosis sel MCF-7. *Majalah Farmasi Indonesia*, vol. 19(1), 12-19.
- 10) Syarifah, M.M. Siti; Nurhanan, M.Y; Haffiz, J. Muhd; Ilham, A. Mohd; Getha,K.; Asiah, O.;Norhayati, I.; Sahira H. Lili.; Suryani, S. Anee., 2011. Potential anticancer compound from *Cerbera odollam*. *Journal of Tropical Forest Scienc*, Vol 23(1). Pp.89-96.
- 11) Sarker, S.D., Latif, z., Gray, A.I. 2006. *Natural Product Isolation*. Humana Press. New Jersey

12) Jordan M.A., 1985. comparison of the effects of Vinblastine, vincristine, vindelistine, and Vinedipine on microtubule dynamics and cell proliferation in vitro. *Cancer Research*, volume 45, pp. 2741-2747.