

CYTOTOXICITY TEST OF ETHANOLIC EXTRACT OF (*Andrographis paniculata* (Burm. f) Nees) LEAVES TOWARDS RAJI CELLS *in Vitro*

UJI SITOTOKSISITAS EKSTRAK ETANOLIK DAUN SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) TERHADAP SEL RAJI (Kajian secara *in Vitro*)

Nisa Nafi'ah Oktaviani¹, Ana Medawati²
Mahasiswa PSPDG FKIK UMY¹, Dosen PSPDG FKIK UMY²

ABSTRACT

Background : *Cancer is one of the main death causes in the world. Raji cells comes from Burkitt's Lymphoma cancer especially B lymphocyte. Conventional cancer therapies such as chemotherapy, radiation, surgery and combination has many negative side effects for the patient's body, therefore, cancer therapies with minimum side effects using herbs are still needed. The extract of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees leaves has an andrographolide active compound that work as an anticancer.*

Objective : *The objective of this study is to test the cytotoxicity potency of ethanolic extract of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees towards raji cells.*

Methods : *Cytotoxic test was using MTT assay (Microculture Tetrazolium Salt), absorbances reading using ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) microplate reader with 550 nm wavelength. The type of this study is a pure laboratory in vitro experiment. Raji cells were given the ethanolic extract of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees leaves in a different concentrations which are 0; 3,125; 6,25; 12,5; 25 dan 50 µg/ml.*

Results : *The result of this study is that the highest potency of ethanolic extract of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees leaves on destroying raji cells in 50µg/ml concentration with cell destroyed was 68,9%. Regression test using SPSS (Statistical Product and Service) shows that ethanolic extract of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) leaves towards raji cells has an IC₅₀ in the amount of 71,632 µg/ml.*

Conclusion : *Ethanolic extract of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees leaves has an in vitro cytotoxicity potency towards raji cells.*

Keywords: **Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees, andrographolide, anticancer, raji cells, cytotoxicity, herbal therapy*

INTISARI

Latar belakang : Kanker merupakan salah satu penyebab kematian utama di dunia. Sel raji berasal dari kanker Burkitt's Lymphoma, limfosit B. Terapi kanker konvensional seperti kemoterapi, radiasi, pembedahan, dan kombinasi memiliki banyak efek negatif bagi tubuh. Pencarian obat antikanker sebagai terapi herbal yang diharapkan efektif dan memiliki efek samping minimal. Ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) memiliki senyawa aktif *andrographolide* mempunyai potensi sebagai antikanker.

Tujuan Penelitian : Penelitian ini bertujuan untuk menguji potensi aktivitas sitotoksik ekstrak etanolik daun sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) terhadap sel raji.

Metode : Uji sitotoksitas menggunakan metode MTT (*Microculture Tetrazolium Salt*), dengan pembacaan absorbansi sel menggunakan ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) *microplate reader* dengan panjang gelombang 550 nm. Jenis penelitian ini merupakan penelitian laboratoris murni dilakukan secara *in vitro*. Sel raji diberikan perlakuan dengan berbagai konsentrasi ekstrak, yaitu 0; 3,125; 6,25; 12,5; 25 dan 50 µg/ml.

Hasil : Potensi aktivitas sitotoksik ekstrak etanolik daun sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) paling besar pada konsentrasi 50 µg/ml dengan kematian sel sebesar 68,9%. Uji regresi menggunakan SPSS (*Statistical Product and Service*) menunjukkan bahwa ekstrak etanolik daun sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) terhadap sel kanker raji memiliki kadar IC₅₀ sebesar 71,632 µg/ml

Kesimpulan : Ekstrak etanolik daun sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) mempunyai potensi aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker raji secara *in vitro*.

Kata kunci: *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees, *andrographolide*, antikanker, sel raji, aktivitas sitotoksik, terapi herbal

PENDAHULUAN

Kanker merupakan pertumbuhan dan penyebaran sel yang tidak terkendali, yaitu sel terus-menerus tumbuh dan membentuk sel abnormal baru tanpa mengalami kematian¹.

Pembelahan sel kanker yang tidak terkendali meningkatkan jumlah sel kanker serta akan mengambil seluruh nutrisi yang tersedia untuk tubuh sehingga pada akhirnya sel-sel normal akan mati karena kekurangan nutrisi².

Sel kanker dapat menyebar/metastasis ke bagian lain dalam tubuh¹.

Kanker menjadi salah satu penyebab kematian utama di dunia dan paling sering ditemukan di negara-negara berkembang^{1,3}. Jumlah penderita kanker di Indonesia mencapai 2.055.526 orang dengan prevalensi terbesar adalah kanker *cervix* pada wanita, dan kanker prostat pada laki-laki⁴.

Kanker memiliki beberapa tipe, antara lain kanker kepala dan leher, kanker rongga mulut dan faring, kanker tulang dan sendi, kanker tulang dan kanker sistem endokrin⁵. Kanker kepala dan leher merupakan kanker yang terjadi di rongga mulut, hidung, faring, laring dan sinus, lidah, orofaring, hipofaring, epifaring, bibir^{6,7}. Sebanyak 2/3 kanker kepala dan leher di dunia dapat mengalami metastasis ke kelenjar limfonodi,

sehingga termasuk tipe kanker limfoma⁶.

Sel raji merupakan sel yang berasal dari kanker *Burkitt's Lymphoma* yang telah terpapar oleh *Eipstein-Barr Virus* (EBV) ditemukan oleh Denis Parsons Burkitt yang berasal dari *maxilla sinistra* seorang pasien anadi Afrika Barat^{10,11}.

Terapi kanker konvensional yang umum digunakan meliputi kemoterapi, pembedahan, radioterapi maupun terapi kombinasi yang biasanya digunakan dengan tujuan memaksimalkan terapi, memiliki efek negatif bagi tubuh¹⁰. Sehingga dikembangkan terapi lain dengan tujuan efek samping minimal bagi tubuh.

Indonesia kaya akan keanekaragaman hayati yang dapat dimanfaatkan khasiatnya sebagai obat. Beberapa tanaman yang telah diteliti memiliki potensi sebagai pengobatan

penyakit kanker seperti Keladi Tikus (*Typhonium flagelliforme* Lodd.), Tapak Dara (*Vinca rosea*), Sirsak (*Annona muricata* L), Pegagan (*Centella asiatica* (L) Urban), Kunyit Putih (*Kaempferia rotunda* (L), Ceplukan (*Physalis minima* L), Manggis (*Garcinia mangostana* (L), Tanaman Sarang Semut (*Myrmecodia peden*) dan Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees)¹¹.

Tanaman Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) adalah tanaman banyak tumbuh di Indonesia, dan di setiap daerah memiliki sebutan nama yang berbeda-beda seperti *pepaitan*, *ki oray*, *ki peurat*, *bidara* dan *sadilata*¹¹. Sambiloto juga memiliki nama lain seperti *chuan xin lian*, *yi jian xi*, dan *lan he lian* (China), *kalmegh*, *kirayat*, dan *kirata* (India), *xuyen tam lien* dan *cong-cong* (Vietnam), *quasabhava* (Arab), *nainehavandi* (Persia), *green*

chiretta dan *king of bitter* (Inggris)¹². Tanaman ini sudah dikenal dalam pengobatan tradisional di Indonesia sebagai antipiretik, antibiotik, antidiabetes namun pada pemeriksaan selanjutnya menunjukkan adanya aktivitas antikanker¹³.

Sambiloto memiliki kandungan kimia antara lain antara lain *andrografolide*, *andrografide*, *neoandrografod*, panikulin, asam kersik, damar serta mineral berupa kalium, kalsium, dan natrium. Senyawa aktif dari tanaman sambiloto yang berperan sebagai senyawa antikanker adalah *andrografolid*¹¹.

Uji sitotoksik merupakan pengujian toksisitas kuantitatif secara *in vitro* untuk mendeteksi adanya aktivitas antineoplastik dari suatu senyawa dengan cara menetapkan kematian sel¹⁴. Prinsip dari metode MTT adalah terjadinya reduksi garam kuning *tetrazolium* MTT oleh sistem

reduktase membentuk kristal formazan berwarna ungu dan tidak larut dalam air¹⁵. Parameter yang digunakan dalam uji sitotoksik adalah nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ adalah nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan pada sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel, semakin besar nilainya maka semakin tidak toksik¹⁴.

Berdasarkan uraian tersebut di atas, maka penting dilakukan penelitian mengenai uji sitotoksitas ekstrak etanolik daun Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) terhadap sel raji.

BAHAN DAN CARA

1. Pembuatan ekstrak etanolik daun sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees)

Daun sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) seberat 1,5 kg dalam bentuk tanaman basah dipetik, dengan kriteria yang telah

ditentukan yaitu daun muda maupun daun tua, segar, tidak ada bekas gigitan ulat lalu dicuci hingga bersih di bawah air mengalir dan dipotong-potong. Daun sambiloto dikeringkan dalam almari pengering pada suhu 45°C sampai benar-benar tidak ada air yang tersisa. Setelah kering, daun sambiloto dijadikan serbuk dengan menggunakan blender sampai halus. Pembuatan ekstrak ini menggunakan metode maserasi, yaitu dengan merendam simplisia serbuk daun sambiloto sebanyak 396,91 gram ke dalam 3000 ml etanol 85%, perendaman pertama dilakukan selama 2 hari. Lalu dilakukan penyaringan dan proses remaserasi selama 2 hari. Penguapan menggunakan *vacuum rotary evaporator* dan *water bath* selama 24 jam. Lalu menghasilkan ekstrak kental sebanyak dan dibuat menjadi beberapa konsentrasi, yaitu 0; 3,125; 6,25; 12,5; 25; dan 50 µg/ml.

2. Persiapan pembiakan sel raji

Sel raji dibiakan dalam larutan RPMI-1640, FBS 10%, dan antibiotic penisilin-streptomisin 1% dalam *flask*. Setelah itu, sel di inkubasi pada suhu 37°C dengan kelembaban udara 95% dan CO₂ 5% selama 24 jam.

3. Panen sel raji

Sel diambil dari inkubator CO₂, kemudian diamati dengan menggunakan mikrosko saat sel dalam kondisi 80% konfluen. Lalu membuang medium yang terdapat pada *flask* kemudian cuci medium (tanpa FBS), dan masukkan kembali ke dalam *flask*, resuspensikan sel dengan menggunakan pipet sampai sel tidak menggerombol kemudian ditransfer ke dalam tabung *centrifuge*, dan ditambahkan medium sampai penuh. Sel diletakkan dalam *centrifuge* selama 10 menit dengan kecepatan 1500 rpm, setelah sel terpisah dengan medium,

buang supernatan, tambahkan 1 ml medium komplit kemudian dihomogenkan. Amati sel dengan menggunakan mikroskop, dan hitung sel dengan menggunakan *counter*.

4. Uji Sitotoksitas metode MTT

Uji aktivitas sitotoksik metode MTT menggunakan plat 96 sumuran. Transferkan sel yang telah diencerkan dengan menggunakan medium ke dalam sumuran, masing-masing 100 µl, usahakan agar sel tetap homogen dengan cara meresuspensi sel setiap kali mengisi 12 sumuran. Setelah itu diamkan selama 1-2 jam, lalu tambahkan 100 µl ekstrak dengan konsentrasi 3,125 µg/ml, 6,25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml dan 50 µg/ml serta sebagai kontrol sel adalah 0 µg/ml, kemudian inkubasikan dalam inkubator pada suhu 37°C dengan kelembaban udara 95% dan CO₂ 5% selama 24 jam.

Sel yang telah diinkubasi gelombang 550 nm, lalu hitung persentase kematian sel menggunakan rumus:

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

Kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop, lalu buang medium dengan cara dibalik pada kertas *tissue*. Tambahkan pada masing-masing *well* 100 μ l MTT (5 mg MTT + 1 ml PBS + 9 ml medium RPMI komplet/medium penumbuh) dan inkubasikan kembali selama 4-6 jam, kemudian amati kondisi sel dengan menggunakan mikroskop *inverted*, jika *formazan* telah terbentuk, tambahkan larutan *stop solution* SDS 10% dalam 0,1 HCL sebanyak 100 μ l pada masing-masing *well*, setelah itu bungkus *plate* dengan menggunakan *aluminium foil* dan inkubasikan kembali sel selama satu malam di dalam suhu ruangan. Hasil uji sitotoksik di dapatkan dengan pembacaan absorbansi menggunakan alat ELISA *reader* dengan panjang

gelombang 550 nm, lalu hitung persentase kematian sel menggunakan rumus:

Keterangan :

OD :Optical Density (Kerapatan optic saat pembacaan absorbansi)

Kontrol :Sel - media

Penentuan dosis toksik pada penelitian ini menggunakan nilai IC_{50} dimana dapat ditentukan seberapa besar kemampuan obat atau bahan inhibitor untuk menghentikan proses biologis tertentu secara kualitatif¹⁴. Nilai IC_{50} dibawah 100 μ g/mL menunjukkan adanya potensi ekstrak uji sebagai agen kemoprevensi¹⁶. Nilai IC_{50} dapat diklasifikasikan sesuai kriteria Score 1/*Weak* ($IC_{50} \geq 50 \mu$ g/ml), Score 2/*Moderately Active* (10μ g/ml $\leq IC_{50} \leq 50 \mu$ g/ml), Score 3/*Active* $IC_{50} \leq 10 \mu$ g/ml¹⁷.

HASIL PENELITIAN

Tabel 1. Hasil penghitungan persentase kematian sel

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Hambatan (%)
50,000	68,9
25,000	62,6
12,500	47,1
6,250	42,2
3,125	33,9

Keterangan :

Konsentrasi : Konsentrasi ekstrak etanolik daun sambiloto

Hambatan : % kematian sel kanker raji

Tabel 1. menunjukkan bahwa dari 5 (lima) konsentrasi ekstrak etanolik daun sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) memiliki nilai persentase hambatan kematian sel kanker raji yang berbeda-beda, semakin besar konsentrasi ekstrak semakin besar pula persentase kematian sel kanker raji. Konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$ menunjukkan persentase kematian sel paling besar yaitu 68,9%

dan konsentrasi 3,125 $\mu\text{g/ml}$ menunjukkan persentase kematian sel paling kecil yaitu 33,9%.

Hasil penghitungan persentase kematian sel tersebut, dianalisis dengan uji regresi menggunakan *Statistical Product and Service* (SPSS) 15.00 for Windows. Hasil analisa menunjukkan bahwa IC_{50} dari ekstrak etanolik daun sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) adalah sebesar 11,602 $\mu\text{g/ml}$.

DISKUSI

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa nilai IC_{50} ekstrak etanolik daun sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) sebesar 11,602 $\mu\text{g/ml}$. Nilai IC_{50} termasuk dalam kategori *moderately active* sesuai dengan kriteria, yang dapat diartikan bahwa dengan nilai yang ada memiliki efek toksik cukup kuat dan

memiliki potensi ekstrak uji sebagai agen kemoprevensi^{16,17}.

Ekstrak etanolik daun sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.)

Nees) memiliki kemampuan toksik untuk menghambat pertumbuhan sel raji dengan konsentrasi yang cukup kecil yaitu 50 µg/ml, namun apabila digunakan konsentrasi yang tidak sesuai dengan daya toksisitasnya justru akan menekan sistem imun dalam tubuh¹⁹.

Penelitian sebelumnya dengan menggunakan tanaman yang sama yaitu sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) membuktikan bahwa ekstrak sambiloto memiliki aktivitas antikanker pada sel kanker neuroblastoma (IMR-32) dan sel kanker kolon manusia (HT-29)¹⁸.

KESIMPULAN

Ekstrak etanolik daun sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.)

Nees) memiliki kemampuan sitotoksik terhadap sel kanker raji dengan nilai IC₅₀ sebesar 11,602µg/ml.

SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan ekstrak etanolik daun sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) terhadap sel kanker raji secara *in vitro* dan *in vivo*.
2. Perlu dilakukan penelitian yang lebih lanjut dengan membandingkan aktivitas sitotoksik pada sel kanker raji dengan sel *vero*, untuk mengetahui pengaruh ekstrak pada sel tubuh yang sehat.
3. Perlu dilakukan penelitian menggunakan ekstrak etanolik daun sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) pada sel kanker lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

1. WHO, 2015. [Online] Available at: <http://www.who.int/topics/cancer/en>
/[Diakses pada 26 Maret 2015].
2. Guyton, A. C. & Hall, J. E., 2008. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Jakarta: Elsevier, EGC.
3. Khandekar, S.P.; Bagdey, P.S.; Tiwari, R.R., 2006. Oral Cancer and Some Epidemiological Factors: A Hospital Based Study. *Indian Journal of Community Medicine*, Volume 31, pp. 157-159.
4. www.riskedas.litbang.depkes.go.id/ (Riset Kesehatan Dasar 2013) diakses pada tanggal 16 Februari 2015 pukul 18.00 WIB, updated pada tanggal 20 Januari 2015.
5. Siegel, R., Ma, J., Zou, Z. & Jemal, A., 2014. Cancer Statistics, 2014. *CA Cancer*, January/February, Volume 64, pp. 9-29.
6. Lutzky, Viviana. P; Moss, Denis J.; Chin, David; Coman, William B.; Parsons, Peter G.; Boyle, Glen M. 2008. Biomarkers for Cancers of the Head and Neck. pp. 5-15.
7. Yamamoto, E., Shibuya, H., Yoshimura, R.-i. & Miura, M., 2002. Site Specific Dependency of Second Primary Cancerin Early Stage Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. Volume 94.
8. Chêne, Arnaud., 2009. *Impact of Malaria on B-Cell Homeostasis and Epstein Barr Virus Reactivation, Endemic Burkitts Lymphoma Pathogenesis*. Thesis. Stockholm, Sweden: Karolinska Institutet.
9. Karpova, M., Schoumans, J., Ernberg, I. & HenterJ-I, 2004. Raji revisited: cytogenetics of the original Burkitt's. *Leukemia*, 30 September, Volume 19, pp. 159-161.
10. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000. *Parameter Standar Umum Tumbuhan Obat*. 1 ed. Jakarta: Direktorat Jenderal

- Pengawasan Obat dan Makanan Direktorat Pengawasan Obat Tradisional.
11. Habibah, Noor Aini, 2009. Efektivitas Penambahan Elisitor Asam Jasmonik dalam Peningkatan Sistesisis Senyawa Bioaktif *Andrographolid* pada Kultur Suspensi Sel Sambiloto. *BIOSAINTEFIKA*, Volume 1, pp. 11-18.
12. Widyawati, T., 2007. Aspek Farmakologi Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees). September, Vol 40, pp. 216-222.
13. DALIMUNTHER, Aminah. 2009. Interaksi Sambiloto (*Andrographis paniculata*). Laporan Penelitian. Sumatera Utara: Universitas Sumatera Utara.
14. Haryoto; Muhtadi; Indrayudha, Peni; Azizah, Tanti; Suhendi, Andi., 2013. Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol Tumbuhan ala (*Cynometra ramiflora* Linn) terhadap Sel Hela, T47D dan WIDR. *Jurnal Penelitian Saintek*, Vol 18(2), pp. 21-28.
15. Prosedur tetap CCRC Fakultas Farmasi UGM. 2012. [Online] Available at: http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/wp-content/uploads/10_sop-uji-sitotoksik-metode-mtt.pdf [diakses pada 10 Desember 2015].
16. Meiyanto, Edy; Susidarti, Ratna Asmah; Handayani, Sri; Rahmi, Fitria., 2008. Ekstrak Etanolik Biji Buah Pinang (*Areca catechu* L.) mampu menghambat proliferasi dan memacu apoptosis sel MCF-7. *Majalah Farmasi Indonesia*, Vol 19(1), pp.12-19.
17. 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.

18. Rajeshkumar, S.; Nagalingam, M.;Ponnanikajamideen, M.; Vanaja, M.; Malarkodi C., 2015. Anticancer Activity Of *Andrographis paniculata* Leaves Extract Against Neuroblastoma (IMR-32) and Human Colon (HT-29) Cancer Cell Line. World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences, Vol 4, pp. 1667-1675.
19. Geethangili, Madamanchi; Rao, Yerra Koteswara; Fang, Shih-Hua; Tzeng, Yew-Min., 2008. Cytotoxicity Constituents from *Andrographis paniculata* Induce Cell Cycle Arrest in Jurkat Cells. Phytotherapy Research, Vol 22, pp.1336-1341.