

**POTENCY OF ETHANOLIC EXTRACT OF SAMBILOTO LEAVES (*Andrographis paniculata* (Burm. f) Nees) ON APOPTOSIS INDUCTION OF RAJI CELLS *In Vitro***

**POTENSI EKSTRAK ETANOL DAUN SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* (Burm. f) Nees) TERHADAP INDUKSI APOPTOSIS PADA SEL RAJI *In Vitro***

Dewi Hestiara Safitri<sup>1</sup>, Ana Medawati<sup>2</sup>  
Mahasiswa PSPDG FKIK UMY<sup>1</sup>, Dosen PSPDG FKIK UMY<sup>2</sup>

**ABSTRACT**

*Cancer is one of the leading causes of death in the world. Raji cells is a cell which come from lymphocyte B cancer. Cancer therapies such as chemotherapy, surgery, radiotherapy, and combination therapy has many side effects. Herbal therapy for cancer has an advantages in an economical way and minimum side effect. Sambiloto leaves (*Andrographis paniculata* (Burm. f) Nees) is a herb with andrographolide substance as it's anticancer. The purpose of this study is to test the potency of ethanolic extracts of sambiloto leaves on apoptosis induction of Raji cells.*

*The method of this study is an in vitro pure laboratory experiment. Raji cells were given with six concentrations of ethanolic extracts of sambiloto leaves (*Andrographis paniculata* (Burm. f) Nees) which were (0; 3,125; 6,25; 12,5; 25 and 50)  $\mu\text{g/ml}$ . Apoptosis testing using double staining method with ethidium bromide and acridine orange. Observed the cells in the fluorescence microscope. Cells counting using one way Anova.*

*The result of this study ethanolic extract of sambiloto leaves (*Andrographis paniculata* (Burm. f) Nees) had a potency on inducing apoptosis of Raji cells in 12,5  $\mu\text{g/ml}$  with the average of cell apoptosis is 32,60%. The conclusion is ethanolic extract of sambiloto leaves (*Andrographis paniculata* (Burm. f) Nees) were effective on inducing apoptosis on Raji cells.*

**Key words** :, *Andrographis paniculata, andrographolide, apoptosis, cancer, raji cell, sambiloto.*

**Abstrak**

Kanker merupakan salah satu penyebab kematian utama yang terjadi di dunia. Sel raji berasal dari kanker limfoma khususnya limfosit B. Terapi kanker seperti kemoterapi, pembedahan, radioterapi maupun kombinasi yang umumnya digunakan memiliki banyak efek samping. Terapi herbal untuk kanker memiliki keunggulan yaitu harga yang ekonomis dan efek samping yang minimal. Daun sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f) Nees) merupakan salah satu tanaman dengan senyawa *andrographolide* sebagai senyawa antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk menguji potensi ekstrak etanol daun sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) terhadap apoptosis sel raji.

Metode eksperimental laboratoris murni secara *in vitro*. Sel raji diberikan perlakuan ekstrak etanol daun sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f) Nees) dengan konsentrasi (0; 3,125; 6,25; 12,5; 25 dan 50) µg/ml. Uji apoptosis menggunakan metode *double staining* dengan pemberian zat pewarna *ethidium bromide* dan *acridine orange* pada sel raji yang sebelumnya dilakukan inkubasi selama 24 jam. Amati sel menggunakan mikroskop *fluorescence*. Analisis data menggunakan *one way ANOVA*.

Ekstrak etanol daun sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f) Nees) berpotensi dalam induksi apoptosis pada sel raji pada konsentrasi 12,5 µg/ml dengan rerata sel yang mengalami apoptosis sebanyak 36,20%. Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak etanol daun sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f) Nees) memiliki potensi dalam induksi apoptosis pada sel raji.

**Kata kunci :** *Andrographis paniculata*, *andrgrapholide*, apoptosis, kanker, sambiloto, sel raji.

## PENDAHULUAN

Kanker merupakan salah satu penyakit ganas yang memiliki angka kematian cukup tinggi di dunia. Kanker ialah suatu kondisi dimana sel telah kehilangan pengendalian dan mekanisme normalnya, sehingga mengalami pertumbuhan yang tidak normal, cepat dan tidak terkendali<sup>1</sup>. Menurut Kementerian Kesehatan (Kemenkes) tahun 2015, kanker merupakan salah satu penyebab kematian utama yang terjadi di seluruh dunia. Pada tahun 2008, dinyatakan bahwa terdapat 12,7 juta kasus kanker dan 7,6 juta kematian yang terjadi akibat kanker<sup>2</sup>.

Kemenkes (2015), menyatakan bahwa pada tahun 2012 terdapat sekitar 8,2 juta kematian yang terjadi akibat kanker. Kanker memiliki berbagai macam jenis berdasarkan lokasinya, antara lain kanker serviks, kanker tulang, kanker darah, kanker hati sampai kanker kepala dan leher.

Sel raji merupakan sel yang berasal dari kanker limfoma khususnya limfosit B<sup>3</sup>. Sel raji biasa disebut juga dengan *Burkitt's lymphoma*. Pemberian nama *Burkitt's lymphoma* berasal dari penemunya yang bernama Denis Parsons Burkitt<sup>4</sup>. Sel raji merupakan sel B limfoma yang telah

terinfeksi oleh *Epstein-Barr Virus* atau EBV<sup>5</sup>. Sel raji dapat disebabkan oleh berbagai macam faktor penyebab, salah satunya ialah infeksi *Epstein-Barr Virus*. Sel raji memiliki persamaan dengan sel kanker yang ada di rongga mulut, karena sama-sama dapat terjadi akibat adanya infeksi *Epstein-Barr Virus*. Terapi konvensional digunakan dalam pengobatan *Burkitt's lymphoma*, namun terapi yang menjadi pilihan utama, yaitu kemoterapi<sup>4</sup>. Terapi konvensional, seperti kemoterapi, terapi radiasi, pembedahan, maupun kombinasi, memiliki banyak efek samping lain terhadap tubuh penderita.

Pengobatan herbal dalam terapi kanker, dapat berupa pemanfaatan bahan herbal yang memiliki senyawa antikanker di dalamnya. Di Indonesia memiliki telah banyak tersebar bahan herbal yang bermanfaat bagi tubuh, khususnya dalam mengobati penyakit kanker, seperti daun keladi tikus, daun tapak dara, daun jambu dan daun sambiloto.

Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) dikenal dengan sebutan

“*King of Bitters*” merupakan tanaman yang efektif digunakan sebagai obat tradisional pada negara-negara di Asia<sup>6</sup>. Sambiloto merupakan tanaman herbal dari keluarga *acanthaceae* yang memiliki berbagai macam manfaat bagi kesehatan tubuh manusia, antara lain sebagai anti kanker, anti bakteri dan anti virus<sup>7</sup>.

Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) mengandung senyawa diterpene, *lactone*, dan flavonoid. Empat senyawa lakton yang ditemukan di dalam daun sambiloto (Akbar, 2011), yaitu *deoxyandrographolide*, *andrographolide*, *neoandrographolide* dan *14-deoxy-11, 12-didehydroandrographolide*<sup>6</sup>. Senyawa flavonoid banyak ditemukan pada bagian akar, tetapi juga dapat ditemukan pada bagian daun<sup>8</sup>. Kandungan dari sambiloto yang digunakan untuk pengobatan antara lain *lactone*, *diterpenoids*, *diterpene glycosides*, *flavonoids*, dan *flavonoid glycosides*<sup>6</sup>. Senyawa bioaktif dalam tanaman sambiloto yang berperan sebagai senyawa anti kanker adalah *andrografolid*<sup>9</sup>.

Apoptosis adalah proses dan tipe kematian sel yang terprogram melalui serangkaian perubahan struktural sebagai hasil dari rangsangan fisiologi atau patologis. Proses apoptosis akan mengeliminasi sel yang sudah rusak dan sel yang masih dapat berfungsi tetap dibiarkan untuk berproliferasi agar dapat melindungi organisme atau tubuh dari kerusakan<sup>10</sup>. Apoptosis dikendalikan oleh keluarga protein Bcl-2, yang terdiri dari pro-apoptosis seperti Bax dan Bak serta anti-apoptosis seperti Bcl-2 dan Bcl-X<sub>L</sub><sup>11</sup>. Hilangnya jalur apoptosis dapat terjadi akibat adanya mutasi gen penekanan p53 dan atau adanya ekspresi abnormal dari gen anti-apoptosis Bcl-2<sup>12</sup>. Apoptosis dapat terjadi melalui dua jalur, antara lain jalur intrinsik dan jalur ekstrinsik. Apoptosis yang terjadi melalui jalur intrinsik disebut juga jalur mitokondria (*mitochondrial pathway*) dan jalur ekstrinsik disebut *death receptor pathway*<sup>13,14</sup>.

Berdasarkan uraian di atas, memberikan inspirasi kepada peneliti untuk melakukan penelitian mengenai uji potensi ekstrak

etanol daun sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) terhadap induksi apoptosis pada sel raji yang dilakukan secara *in vitro*.

## **BAHAN DAN CARA**

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

Daun sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) dipetik dan dicuci sampai bersih di bawah air mengalir. Daun sambiloto dikeringkan menggunakan lemari pengering dengan suhu 45°C selama 48 jam. Setelah kering, daun sambiloto dijadikan serbuk dengan menggunakan alat penyerbuk sampai halus. Pembuatan ekstrak etanol daun sambiloto menggunakan metode maserasi, yaitu dengan merendam sebanyak 396,91 gram serbuk daun sambiloto kedalam 3000 mL larutan etanol 85% sebagai pelarut. Selanjutnya filtrat diuapkan dengan menggunakan *vaccum rotary evaporator* dan pemanas *water bath* suhu 60°C. Kemudian encerkan dan dibuat menjadi beberapa

konsentrasi, yaitu 0; 3,125; 6,25; 12,5; 25; dan 50 µg/ml.

## 2. Persiapan biakan sel Raji

Sel raji dibiakan dalam larutan RPMI-1640, FBS 10%, antibiotik penisilin-streptomisin 2%, dan fungizon 0,5%. Sel di inkubasi pada suhu 37°C dengan kelembaban udara 95% dan CO<sub>2</sub> 5%. Setelah itu, lakukan perhitung sel yang dibutuhkan dengan menggunakan bilik hitung dan didapatkan hasil sel yang diperlukan adalah 1 x 10<sup>5</sup> sel/well.

## 3. Uji Apoptosis

Sel raji dibiakkan dalam *cover slip* diameter 13 mm. *Cover slip* diletakkan pada plat 24 berdiameter 60 mm dan transfer sel kedalam sumuran dengan mikropipet sebanyak 1 x 10<sup>5</sup> sel/well. Kemudian dilakukan *treatment* dengan pemberian RPMI-1640 yang mengandung berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun sambiloto, yaitu 0; 3,125; 6,25; 12,5; 25; dan 50 µg/ml, kemudian dimasukkan ke dalam inkubator selama 24 jam. Setelah itu dilakukan pengecatan menggunakan *acridine orange*

dan *etidium bromide* lalu amati sel dengan menggunakan mikroskop *flouresence*, kemudian hitung sel yang mengalami apoptosis. Sel yang mengalami apoptosis akan berwarna orange atau kekuningan, sedangkan sel yang tidak mengalami apoptosis berwarna hijau.

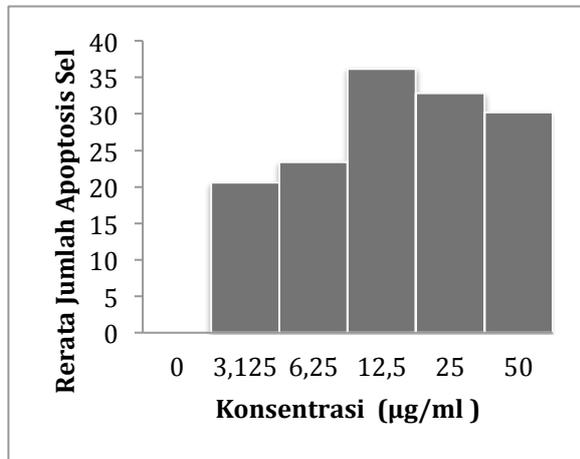
## HASIL PENELITIAN

Tabel 1. Rerata dan simpang baku sel raji yang mengalami apoptosis

Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sambiloto (µg/ml)	Rerata ± Standar Deviasi
0 (Kontrol)	.00 ± .00
3,125	20.60 ± 2.510
6,25	23.40 ± 7.301
12,5	36.20 ± 1.924
25	32.80 ± 1.924
50	30.20 ± 3.271

Tabel 1. di atas menunjukkan hasil rerata dan simpang baku dari sel raji yang mengalami apoptosis setelah diberi perlakuan dengan ekstrak etanol daun sambiloto, terlihat bahwa terdapat peningkatan kematian sel pada konsentrasi 3,125; 6,25; dan 12,5 µg/ml dengan rerata sebesar 20.60%; 23.40%; dan 36.20%.

Penurunan rerata apoptosis sel terjadi pada konsentrasi 25 dan 50  $\mu\text{g/ml}$  dengan rerata saebesar 32.80% dan 30.20%.



Gambar 1. Grafik rerata sel yang mengalami apoptosis

Berdasarkan gambar grafik di atas, diketahui bahwa rerata sel yang mengalami apoptosis dengan jumlah tertinggi, yaitu pada konsentrasi 12,5  $\mu\text{g/ml}$  sebesar 36.20%.

Tabel 2. Data Hasil Uji Normalitas *Shapiro Wilk* dengan berbagai konsentrasi

Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sambiloto ( $\mu\text{g/ml}$ )	DF	Signifikan (p)
3,125	5	.105
6,25	5	.540
12,5	5	.928
25	5	.928
50	5	.203

Berdasarkan Tabel 2. diketahui bahwa hasil dari uji normalitas *Shapiro Wilk*

memiliki signifikansi (p) lebih dari 0,05 ( $p > 0,05$ ), sehingga dapat dikatakan bahwa semua perlakuan memiliki data yang terdistribusi normal.

Tabel 3. Tes Homogenitas Variansi

Levene Statistic	df 1	df 2	Sig.
2.508	5	24	.058

Tabel 3. menunjukkan bahwa hasil tes homogenitas variansi, yaitu sig. (p) = .058 atau ( $p > 0,05$ ), sehingga data tersebut bersifat homogen atau tidak terdapat perbedaan yang bermakna variansi antar kelompok.

Uji *one way* ANOVA memiliki dua syarat, yaitu data harus terdistribusi normal dan data bersifat homogen. Berdasarkan hasil dari uji normalitas *Shapiro Wilk* dan Tes Homogenitas Variansi, maka diketahui bahwa data tersebut memenuhi syarat untuk dilakukan analisis dengan menggunakan Uji *one way* ANOVA.

Tabel 4. Hasil Uji *One Way* ANOVA

Uji Apoptosis					
	<i>Sum of Squares</i>	df	<i>Mean Square</i>	F	Sig. (p)
Antar Kelompok					
Kelompok	4262.667	5	852.533	65.833	.000
Dalam					
Dalam	310.800	24	12.950		

Kelompok	
Total	4573.467 29

Berdasarkan Tabel 4. hasil dari uji *One Way* ANOVA menunjukkan nilai signifikansi ( $p$ ) = 0,000 atau  $p < 0,005$ . Hal tersebut berarti bahwa terdapat perbedaan yang signifikan atau bermakna antara dua kelompok yang dibandingkan.

Perbedaan rerata antara masing-masing konsentrasi dari ekstrak etanol daun sambiloto, dapat diketahui dengan uji *Post Hoc* menggunakan LSD (*Least Significant Different*). Hasil dari uji LSD menunjukkan bahwa nilai  $p < 0,005$  sehingga data tersebut memiliki perbedaan yang bermakna antara masing-masing konsentrasi.

## DISKUSI

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) memiliki potensi dalam induksi apoptosis pada sel Raji. Konsentrasi dengan rerata sel yang mengalami apoptosis tertinggi ialah pada konsentrasi 12,5  $\mu\text{g/ml}$ , dengan rerata sebesar 36.20%. Hasil ini sejalan dengan

penelitian yang dilakukan oleh Sukardiman *et al.*, pada tahun 2006, yaitu senyawa *andrographolide* sebagai senyawa antikanker yang terkandung dalam tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) memiliki potensi dalam induksi apoptosis pada sel HeLa (sel kanker mulut rahim) dengan konsentrasi sebesar 109,90  $\mu\text{g/ml}$ . Hal tersebut juga sejalan dengan penelitian sebelumnya, bahwa senyawa *andrographolide* yang terkandung di dalam tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) sebagai senyawa antikanker terbukti dapat menghambat kerusakan fungsi paru-paru pada mencit yang menderita kanker paru-paru<sup>16</sup>.

Tanaman sambiloto memiliki berbagai macam senyawa, antara lain senyawa lakton, flavonoid, dan diterpene<sup>6</sup>. Salah satu dari senyawa lakton ialah *andrographolide*. *Andrographolide* merupakan senyawa antikanker yang terkandung di dalam tanaman sambiloto<sup>9</sup>. Senyawa *andrographolide* mampu menginduksi apoptosis pada sel kanker melalui jalur

instrinsik dengan cara meningkatkan ekspresi dari bax p53, caspase-3, dan menurunkan ekspresi dari bcl-2<sup>15</sup>.

Penelitian lain dengan menggunakan tanaman yang sama, yaitu tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) mengungkapkan bahwa ekstrak sambiloto memiliki pengaruh dalam menghambat proliferasi terhadap adenokarsinoma mamma<sup>17</sup>.

## KESIMPULAN

Berdasarkan dari hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Ekstrak etanol daun sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) memiliki potensi dalam induksi apoptosis pada sel raji.
2. Konsentrasi dari ekstrak etanol daun sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) yang paling berpotensi dalam induksi apoptosis pada sel raji ialah pada konsentrasi 12,5 µg/ml dengan rerata sebesar 36.20%.

## SARAN

Adapun saran terkait penelitian ini, antara lain :

1. Penelitian ini dilakukan secara *in vitro*, sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut terkait ekstrak etanol daun sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) terhadap potensi dalam induksi apoptosis pada sel raji secara *in vivo*.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh ekstrak etanol daun sambiloto pada sel kanker lain.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Suastina, I. D., Ticoalu, S. H., & Onibala, F. (2013). Pengaruh Pendidikan Kesehatan Terhadap Tingkat Pengetahuan Siswi Tentang Sadari Sebagai Deteksi Dini Kanker Payudara Di SMA Negeri 1 Manado. *Ejournal Keperawatan* , 1-6.
2. Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D.

- (2011). Global Cancer Statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* , 69-90.
3. Salimi, Y. K., & Zakaria, R. F. (2012). Penghambatan Ekstrak Sorgum (*Sorghum bicolor*) Terhadap Proliferasi Sel Kanker Limfoma. *Sainstek* , 1-2.
  4. Nafianti, S., Windiastuti, E., & Gatot, D. (2008). Gambaran Limfoma Burkitt di Departemen Ilmu Kesehatan Anak RSUP Cipto Mangunkusumo Jakarta. *Sari Pediatri* , 47-52.
  5. Diastuti, H., Warsinah, & Purwati. (2009). Aktivitas Antikanker Ekstrak Etanol Daun *Rhizopora mucronata* Terhadap Larva Udang *Artemia Salina* Leach Dan Sel Raji. *Molekul* , 12-20.
  6. Akbar, S. (2011). *Andrographis paniculata*: A Review of Pharmacological Activities and Clinical Effect. *Alternative Medicine Review*, 66-77.
  7. Talei, D., Valdiani, A., Rafii, M. Y., & Maziah, M. (2014). Proteomic Analysis of The Salt-Responsive Leaf and Root Proteins in The Anticancer Plant *Andrographis paniculata* Nees. *Plos One*, 9 (11), 1-10.
  8. Ratnani, R. D., Hartati, I., & Kurniasari, L. (2012). Potensi Produksi *Andrographolide* Dari Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) Melalui Proses Ekstraksi Hidrotropi. *Momentum*, 6-10.
  9. Habibah, N. A. (2009). Efektivitas Penambahan Elisitor Asam Jasmonik dalam Peningkatan Sintesis Senyawa Bioaktif *Andrografolid* pada Kultur Suspensi Sel Sambiloto. *Biosaintifika*, 11-18.
  10. Supriyadi. (2008). Evaluasi Apoptosis Sel Odontoblas Akibat Paparan Radiasi Ionisasi. *Indonesian Journal of Dentistry* , 71-76.
  11. Lutfiyah, Y., & Santoso, B. (2014). Pemodelan Tiga Dimensi (3D) Ikatan Hasil *Docking* Molekular Turunan Diketopiperazin (DKP) Dengan Bcl-2 Sel MCF-7. *Jurnal Farmasi UMS* , 1-9.
  12. Yusuf, H. Y. (1999). Peran Gen p53 dan Regulasi Apoptosis Pada Perkembangan

- Kanker, Khususnya Karsinoma Kepala dan Leher. *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Indonesia* , 44-49.
13. Crow, M. T., Mani, K., Nam, Y. J., & Kritsis, R. M. (2004). The Mitochondrial Death Pathway and Cardiac Myocyte Apoptosis. *Circ.Res* , 957-969.
14. Chang, H. Y., & Yang, X. (2002). Proteases for Cell Suicide: Functions and Regulation of Caspase. *Microbiol.Mol.Biol.Rev* , 821-846.
15. Sukardiman, Harjotaruno, Widyawaruyanti, A., Sismindari, Zaini, N. C. (2007). Apoptosis Inducing Effect of *Andrographolide* on TD-47 Human Breast Cancer Cell Line. *Afr J Tred CAM* , 345-351.
16. Tung, Y., Chen, H., Tsai, H., Yang, S., Chang, Y., & Chen, C. (2013). Therapeutic Potential of *Andrographolide* Isolated From The Leave of *Andrographis paniculata* Nees For Treating Lung Adenocarcinomas. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-8.
17. Nugrahaningsih, W. H. (2013). Studi Eksplorasi Sambiloto (*Andrographis Paniculata*) Sebagai Antikanker Melalui Pengaruhnya Terhadap Angiogenesis Dan Proliferasi Sel Adenokarsinoma Mamma Mencit C3h [abstrak].