

**STUDI EFIKASI DAN KEAMANAN EKSTRAK AKAR DAN DAUN
Calotropis gigantea TERHADAP SEL KANKER KOLON DAN SEL KANKER
PAYUDARA SECARA IN VITRO**

Roihatul Mutiah

¹*Departement of Pharmacy, Faculty of Medical and Health Sciences, Universitas Islam Negeri
Maulana Malik Ibrahim, Malang Indonesia
roiha@farmasi.uin-malang.ac.id*

ABSTRAK

Pengembangan fitofarmaka untuk penyakit kanker sampai saat ini menjadi langkah utama dalam mengatasi kegagalan terapi kanker. *Calotropis gigantea* adalah salah satu tanaman yang telah terbukti secara ilmiah baik *in vitro* maupun *in vivo* sebagai agen kemopreventif. Penelitian ini bertujuan untuk menjelaskan efikasi dan keamanan ekstrak daun *Calotropis gigantea* (EDCG) dan ekstrak akar *Calotropis gigantea* (EACG) pada sel normal NIH3T3, sel kanker kolon WiDr dan sel kanker payudara T47D. Dari hasil analisis MTT dan analisis *Selectivity Index* (SI) didapatkan hasil bahwa Ekstrak etanol daun *Calotropis gigantea* (EDCG) dapat menghambat pertumbuhan sel kanker kolon WiDr secara selektif (SI>3) namun tidak selektif dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara T47D (SI<3). Ekstrak etanol akar *Calotropis gigantea* (EACG) tidak selektif dalam menghambat pertumbuhan sel kanker kolon WiDr dan sel kanker payudara T47D (SI<3). Oleh karena itu EDCG dapat direkomendasikan sebagai kandidat Fitofarmaka dengan pembuktian lebih lanjut melalui uji klinik.

Katakunci : *Calotropis gigantea*, Sel NIH3T3, Sel WiDr, Sel T47D, efikasi, keamanan, *Selectivity Index* (SI)

ABSTRACT

Development of phytopharmaca for cancer until now has become a major step in overcoming the failure of cancer therapy. Calotrophis gigantea is one of the scientifically proven plants both in vitro and in vivo as a chemopreventive agent. This study aims to explain the efficacy and safety of Calotropis gigantea leaf extract (EDCG) and Calotropis gigantea root extract (EACG) on NIH3T3 cell, colon cancer cell WiDr and T47D breast cancer cells. From the analysis of MTT and Selectivity Index (SI) analysis showed that ethanol extract of leaf Calotropis gigantea (EDCG) can inhibit selective growth of selective colon cancer cells (SI > 3) but not selective in inhibiting the growth of breast cancer cells T47D (SI < 3). Calotropis gigantea (EACG) root ethanol extract is not selective in inhibiting the growth of colon cancer cells WiDr and breast cancer cells T47D (SI < 3). Therefore EDCG can be recommended as a Phytopharmaca candidate with further proof through clinical trials.

Keywords: *Calotrophis gigantea*, NIH3T3 Cells, WiDr Cells, T47D Cells, efficacy, safety.

PENDAHULUAN

Kanker payudara kolon termasuk dalam kelompok lima kanker penyebab kematian terbanyak di dunia selain kanker paru-paru, lambung dan hati. Kanker payudara menyebabkan 519.000 kematian pertahun sedangkan kanker kolon menyebabkan 608.000 kematian per tahun [1]. Penelitian di Amerika menyatakan satu dari delapan wanita Amerika terserang kanker payudara dan 30% dari penderita mengalami kematian [2]. Di Indonesia, prevalensi kanker payudara menduduki peringkat ke-2 setelah kanker leher rahim dan merupakan penyebab kematian utama bagi kaum wanita. Dari semua kasus pada wanita Indonesia, pada tahun 1991 kasus kanker payudara mencapai 17.77% [3].

Pengembangan pengobatan untuk penyakit kanker sampai saat ini sangat perlu untuk dikembangkan. Hal ini disebabkan karena seringnya terjadi kegagalan terapi kanker baik melalui kemoterapi, pembedahan dan radioterapi. Kegagalan terapi tersebut disebabkan karena terjadinya resistensi sel kanker terhadap obat kemoterapi dan timbulnya efek samping yang sangat serius pada pasien. Efek samping timbul karena obat kemoterapi tidak spesifik hanya membunuh sel kanker namun sel normal juga ikut terbunuh. Pengembangan terapi kanker melalui pengembangan bahan alam baik sebagai agen kemopreventif maupun untuk agen fitofarmaka sangat penting untuk dikembangkan. Karena kelebihan produk bahan alam adalah efek samping yang ditimbulkan lebih kecil dari obat sintesis.

Calotropis gigantea (L.) W.T Aiton (*C.gigantea*) merupakan tanaman obat tradisional yang tumbuh tersebar di Indonesia. Tanaman ini secara turun temurun telah dimanfaatkan oleh masyarakat Indonesia sebagai obat gatal-gatal, kudis, bisul, batuk, trakhoma, konstipasi (daunnya), asma, mual, nyeri lambung (bunganya), rajasinga, digigit ular berbisa (akarnya), sakit gigi, bengkak-bengkak, radang telinga, cacingan dan disentri [4]. Pada penelitian sebelumnya telah dilaporkan bahwa senyawa calotropin dari bagian akar mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap Leukemia K562 dan *gastric cancer* 7901 [5]; ekstrak etanol daun *C.gigantea* mampu menghambat pertumbuhan fibrosarcoma secara *in vivo* pada dosis 100 dan 150 mg/kgbb dengan mekanisme peningkatan ekspresi caspase-3 [6]. Ekstrak akar *C.gigantea* mempunyai aktivitas antikanker yang lebih tinggi dibanding bagian daun dan bagian bunga [7]. Fraksi etil asetat dari bagian daun (IC_{50} 41.79 μ g/ml) dan fraksi diklorometan (IC_{50} 40.57 μ g/ml) mempunyai aktivitas sitotoksik yang lebih tinggi dibanding fraksi butanol (IC_{50} 737.74 μ g/ml) dan air (IC_{50} 8493 μ g/ml) [8].

Oleh karena itu pada penelitian ini dilaporkan tentang hasil uji aktivitas dan keamanan secara *in vitro* dari Ekstrak Etanol Daun *Calotropis gigantea* (EDCG) dan Ekstrak Etanol Akar *Calotropis gigantea* (EACG). Parameter aktivitas antikanker EDCG dan

EACG dilakukan terhadap sel kanker kolon WiDr dan Sel T47D sedangkan untuk parameter keamanan dilakukan terhadap sel normal fibroblast NIH3T3 untuk menentukansitotoksitasnya. Selanjutnya ditentukan Selektifitas Indeks dari aktivitas antikanker ekstrak uji.

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

Bahan Uji

Bahan uji yang digunakan adalah bagian akar dan bagian daun *Calotropis gigantea* yang didapatkan dari Malang Jawa Timur. Determinasi tanaman dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Purwodadi Jawa Timur.

Bahan untuk ekstraksi

Pelarut yang akan digunakan untuk tahap ekstraksi maserasi adalah etanol 70% (Merck).

Bahan untuk kultur sel

Sel kanker yang digunakan pada penelitian ini adalah sel *line* kanker kolon WiDr dan sel kanker payudara T47D. Sel tersebut diperoleh dari *Cancer Chemoprevention Research Centre* (CCRC), Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada dan dari Prof. Masasi Kawaichi, *laboratorium of Gene Function in Animal, Graduate School of Biological Science, Nara Institute of Science and Technology*.

Sel WiDr dan sel T47D dalam medium *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI) ditambah dengan 10% *heat-inactivated fetal bovine serum* (FBS)(PAA Laboratories), 1% v/v penicillin-streptomycin (Nacal Tesque), dan 1,0mM L-glutamin (Nacal Tesque). Kemudian sel dikultur dalam inkubator, pada 5% CO₂, 95% O₂ suhu 37°C.

Bahan uji sitotoksik

Dimetil sulfoksida (DMSO) digunakan untuk melarutkan Ekstrak Daun *Calotropis gigantea* (EDCG). Konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini maksimal 1% dalam medium kultur. 0,025% tripsin dalam medium kultur digunakan untuk memanen sel. Phosphate buffer saline (PBS) digunakan sebagai larutan penyangga pencuci. *3-(4,5-dimetiltiazole-2-il)-2,5-difeniltetrazolium* (MTT) digunakan sebagai reagen yang bereaksi dengan enzim suksinat dehidrogenase pada sel. 5 Fluorouracil, Doxorubisin sebagai agen kemoterapi dikombinasikan dengan EDCG.

Alat

Alat utama yang diperlukan dalam penelitian ini adalah maserator, evaporator, sentrifuse, tangki nitrogen cair, *CO₂-Jacketed Incubator*, mikroskop fase kontras, *Laminar Air Flow cabinet* (Nuair), *Elisa reader*.

Metode Penelitian

Ekstraksi

Dimasukkan 10 bagian simplisia (akar/daun) dengan derajat halus kedalam sebuah bejana, dituangi dengan 75 bagian cairan penyari, ditutup, biarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil sering diaduk, diserkai, diperas, ampas dicuci dengan cairan penyari secukupnya hingga diperoleh 100 bagian. Dipindahkan kedalam bejana tertutup, dibiarkan ditempat sejuk, terlindung dari cahaya selama 2 hari. Di enaptuangkan dan disaring. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan lalu diuapkan dalam *rotary evaporator* pada suhu 50°C. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian dikeringkan dan didesikator vakum dan selanjutnya dialiri gas N₂ untuk menghilangkan semua sisa pelarut pada ekstrak. Ekstrak etanol dari bagian daun *Calotropis gigantea* disebut EDCG, Ekstrak etanol dari bagian akar *Calotropis gigantea* disebut EACG.

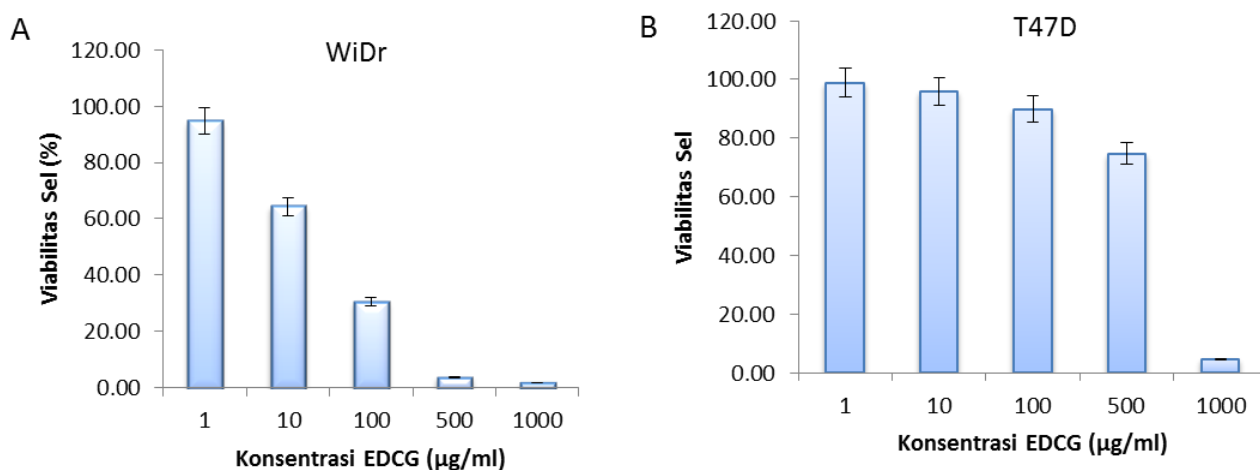
Uji aktivitas sitotoksik metode MTT

Suspensi sel (kanker kolon WiDr, sel T47D, Sel NIH3T3) masing-masing sebanyak 100 µL dengan kepadatan 3×10^4 sel/100 µL media didistribusikan ke dalam sumuran-sumuran pada *96-well plate* dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah diinkubasi, ke dalam sumuran dimasukkan 100 µL larutan uji pada berbagai seri konsentrasi. Sebagai kontrol positif ditambahkan 100 µL medium kultur, kemudian 100 µL cisplatin pada berbagai seri konsentrasi ke dalam sumuran yang telah berisi 100 µL suspensi sel. Sebagai kontrol sel ditambahkan 100 µL medium kultur ke dalam sumuran yang berisi 100 µL suspensi sel dan sebagai kontrol pelarut ditambahkan 100 µL DMSO ke dalam sumuran yang berisi 100 µL medium kultur dan 100 µL suspensi sel dengan delusi yang sesuai dengan delusi konsentrasi larutan uji, kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator dengan aliran 5% CO₂ dan 95% O₂. Pada akhir inkubasi, media kultur dibuang lalu ditambahkan 10 µL larutan MTT (5 mg/mL PBS), dan medium diganti dengan 190 µL medium RPMI 1640 komplet. Kemudian sel diinkubasi selama 3-4 jam. Reaksi MTT dihentikan dengan penambahan reagen *stopper* SDS (100 µL). *Microplate* kemudian dibungkus dengan *tissue* dan diinkubasi selama 1 malam pada suhu kamar dan ruangan gelap. Sel yang hidup bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu. Hasil pengujian dibaca dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 595 nm [9].

HASIL DAN PEMBAHASAN

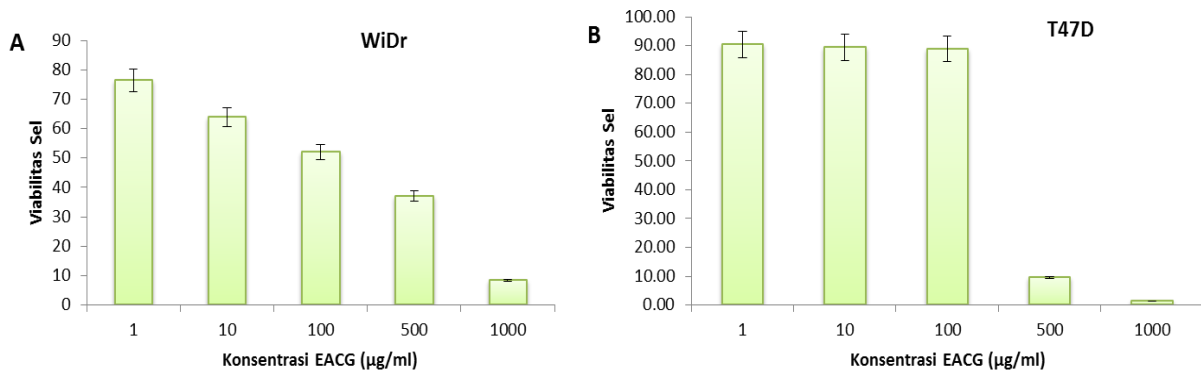
Analisis hasil aktivitas antikanker EDCG dan EACG terhadap sel kanker kolon WiDr dan sel kanker payudara T47D

Tujuan uji aktivitas antikanker EDCG dan EACG terhadap sel kanker kolon WiDr dan sel kanker payudara T47D adalah untuk mengetahui perbandingan efektifitas kedua ekstrak terhadap kedua sel yang berbeda. Dikarenakan efektifitas suatu bahan uji mempunyai efikasi yang berbeda terhadap jenis sel yang berbeda. Aktivitas antikanker EDCG dan EACG terhadap sel kanker kolon WiDr dan sel T47D disajikan pada gambar 1 dan gambar 2.



Gambar 1. Perbandingan efek penghambatan pertumbuhan sel akibat : A) perlakuan Ekstrak etanol Daun *Calotropis gigantea* (EDCG) terhadap sel kanker kolon WiDr; B) perlakuan EDCG terhadap sel kanker payudara T47D dengan metode reduksi MTT. Sel sebanyak 10^4 sel/sumuran ditanam dalam 96 well plate, diinkubasi selama 24 jam dalam media RPMI komplet. Data merupakan representasi dari 3 (tiga) eksperimen yang berbeda dengan hasil yang konsisten dan masing-masing eksperimen dilakukan dengan 3(tiga)x replikasi.

Pada gambar 1 dapat diketahui bahwa perlakuan EDCG terhadap sel kanker kolon WiDr menyebabkan viabilitas sel kanker semakin menurun dengan peningkatan dosis. Sedangkan perlakuan EDCG terhadap sel kanker payudara T47D menunjukkan bahwa peningkatan dosis tidak berpengaruh terhadap viabilitas sel kanker.



Gambar 2. Perbandingan efek penghambatan pertumbuhan sel akibat : A) perlakuan Ekstrak etanol Akar *Calotropis gigantea* (EACG) terhadap sel kanker kolon WiDr; B) perlakuan EACG terhadap sel kanker payudara T47D dengan metode reduksi MTT. Sel sebanyak 10^4 sel/sumuran ditanam dalam 96 well plate, diinkubasi selama 24 jam dalam media RPMI komplet. Data merupakan representasi dari 3 (tiga) eksperimen yang berbeda dengan hasil yang konsisten dan masing-masing eksperimen dilakukan dengan 3(tiga)x replikasi.

Gambar 2 di atas menjelaskan tentang perbandingan pengaruh perlakuan ekstrak akar *Calotropis gigantea*(EACG) terhadap viabilitas sel kanker kolon WiDr dan sel T47D. pada gambar A dapat diketahui bahwa pemberian perlakuan EDCG terhadap sel kanker kolon WiDr dapat menurunkan viabilitas sel seiring dengan peningkatan dosis EDCG. Sedangkan pada gambar B dapat dijelaskan bahwa perlakuan EACG tidak berpengaruh terhadap viabilitas sel kanker payudara T47D yang dibuktikan dengan masih tingginya viabilitas sel sampai dosis $100\mu\text{g/ml}$.

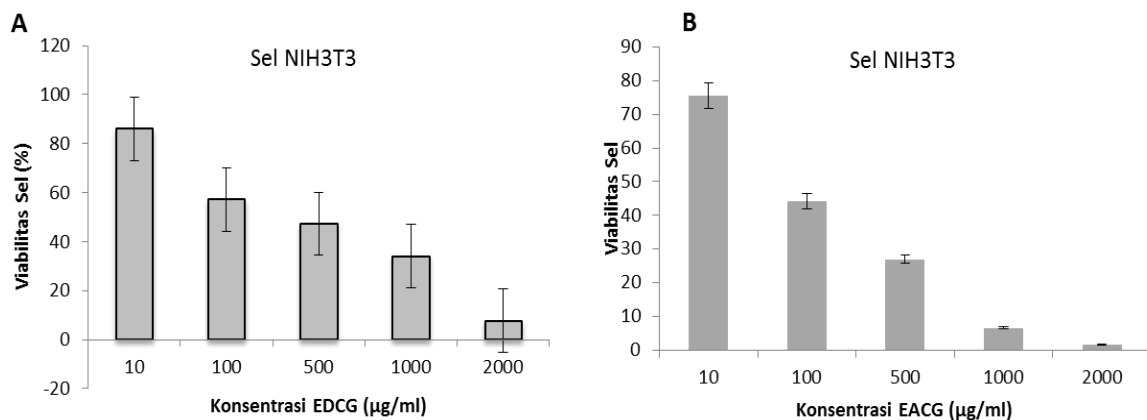
Hasil uji sitoksisitas EDCG dan EACG pada sel normal fibroblast NIH3T3

Hasil uji aktivitas antikanker EDCG dan EACG pada sel kanker kolon WiDr menunjukkan potensi yang cukup tinggi namun terhadap sel kanker payudara T47D tidak menunjukkan adanya aktivitas antikanker. Sebelum dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai potensinya sebagai antikanker perlu dipastikan terlebih dahulu efek sitotoksiknya terhadap sel normal. Efek toksik pada sel normal menjadi permasalahan besar pada terapi kanker, berupa efek samping yang dapat menurunkan kualitas hidup pasien. Efek toksisitas EDCG dan EACG di sajikan pada tabel di bawah ini:

Tabel 1. Rata-rata persen viabilitas sel dan nilai IC₅₀EDCG dan EACG terhadap sel normal fibroblast NIH3T3

No	Ekstrak	Rata-rata % viabilitas sel NIH3T3 pada konsentrasi uji (µg/mL)					IC ₅₀ (µg/mL)
		10	100	500	1000	2000	
		1	Ekstrak Etanol daun	86.0	57.2	47.3	
2	Ekstrak Etanol Akar	75.4	44.3	27.1	6.6	1.6	60.8

Untuk keperluan uji sitotoksitas pada sel normal di gunakan sel NIH3T3, yang merupakan sel fibroblast normal dari embrio tikus. Pemberian perlakuan EDCG dan EACG terhadap sel NIH3T3 menunjukkan adanya efek penekanan pertumbuhan sel mulai dosis 100µg/ml. Profil pengaruh perlakuan EDCG dan EACG terhadap viabilitas sel normal NIH3T3 di sajikan pada gambar di bawah ini:



Gambar 3. Pengaruh perlakuan EDCG dan EACG terhadap pertumbuhan sel NiH3T3. Sel sebanyak 10⁴ sel/sumuran ditanam dalam 96 well plate, diinkubasi selama 24 jam. Sel diberi perlakuan EDCG dan EACG (10-2000 µg/mL) dengan waktu inkubasi 24 jam. Viabilitas sel ditentukan dengan metode MTT. Analisis t test dengan taraf kepercayaan 95% menunjukkan konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini (10-1000 µg/mL) tidak menyebabkan penghambatan pertumbuhan sel yang signifikan. Data merupakan representasi dari 3 (tiga) eksperimen yang berbeda dengan hasil yang konsisten dan masing-masing eksperimen dilakukan dengan 3(tiga)x replikasi.

Analisis hasil Selectivity Index (SI) perlakuan EDCG dan EACG terhadap sel kanker kolon WiDr, Sel kanker T47D dan sel normal fibroblast NIH3T3

Tujuan analisis ini adalah untuk mengetahui apakah pemberian EDCG dan EACG bersifat selektif dalam membunuh sel target yaitu sel kanker kolon WiDr dan atau sel kanker payudara T47D. Suatu bahan uji dikatakan bersifat selektif hanya membunuh sel target apabila nilai *Selectivity Index* (SI) >3 [9]. Nilai *Selectivity Index* (SI) di peroleh dari

perbandingan konsentrasi yang dapat membunuh 50% sel normal (CC_{50}) dibandingkan dengan konsentrasi yang dapat membunuh 50% sel kanker (IC_{50}). Tabel hasil perhitungan SI disajikan pada tabel 2 dibawah ini.

Tabel 2. Nilai *Selectivity Index* (SI) dari EDCG dan EACG terhadap sel kanker kolon WiDr dan sel T47D

Sampel	$IC_{50} \pm SD^*$			<i>Selectivity Index</i> (SI) [CC_{50}/IC_{50}]**	
	Sel WiDr	Sel T47D	Sel NIH3T3	Sel WiDr	Sel T47D
EDCG	48.47±2.45	459.51±24.2	203.00±9.89	4.19	0.44
EACG	44.20±2.30	89.75±5.67	60.80±3.67	1.38	0.68

*Rata-rata $IC_{50} \pm$ standart deviasi, eksperimen dilakukan 3 kali replikasi

** Nilai indeks selektifitas (SI)= CC_{50}/IC_{50} , bahan uji bersifat selektif terhadap sel target jika $SI > 3$

Berdasarkan data penghitungan indeks selektifitas pada tabel 2 dapat diketahui bahwa yang memiliki nilai $SI > 3$ adalah EDCG terhadap sel kanker kolon WiDr dengan nilai SI yaitu 4.19. Sedangkan EDCG terhadap sel kanker payudara T47D, EACG terhadap sel kanker WiDr dan T47D memiliki nilai $SI < 3$. Hal ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun *Calotropis gigantea* (EDCG) bersifat selektif dalam menghambat pertumbuhan sel kanker kolon WiDr namun tidak selektif dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara T47D. Sedangkan EACG tidak selektif dalam menghambat pertumbuhan sel kanker kolon WiDr dan sel kanker payudara T47D.

KESIMPULAN

Ekstrak etanol daun *Calotropis gigantea* (EDCG) dapat menghambat pertumbuhan sel kanker kolon WiDr secara selektif ($SI > 3$) namun tidak selektif dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara T47D ($SI < 3$). Ekstrak etanol akar *Calotropis gigantea* (EACG) tidak selektif dalam menghambat pertumbuhan sel kanker kolon WiDr dan sel kanker payudara T47D ($SI < 3$).

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada RistekDikti atas dana hibah PEKERTI pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] American Cancer Society. *Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition*. Am Cancer Soc. 2015;(800):1–64.
- [2] Tjindrabumi D & Mangunkusumo R. 2002. *Cancer In Indonesia, Present and Future*. *Jpn.J.Clin.Oncol*.32
- [3] King R.J.B.,2000. *Cancer Biology*. 2nd edition. School of Biological Science. University of Surrey. Pearson Education. Harlow-England-London-New York. hal.228-231,263-264
- [4] Mardisiswojo danRadjakmanugunsudarso . 1968. Cabe Puyang Warisan Nenek Moyang.. p. 4–4.
- [5] Wang Z-N, Wang M-Y, Mei W-L, Han Z, Dai H-F. 2008. A new cytotoxic pregnanone from *Calotropis gigantea*. *Molecules*. 13(12):3033–9.
- [6] Mutiah, R., Griana, T.P., et al., 2016a. The Effect of *Calotropis gigantea* Leaves Extract on Fibrosarcoma Growth and Caspase 3 Expression .*Interational Journal Phamaceutical and Clinial Research*, 8(3), pp.167–171.
- [7] Mutiah, R., Sukardiman., Widyawaruyanti, A., Zulaikah, S., 2016b. Comparison of Ethanol Extract from Roots Leaves and Flowers of *Calotropis gigantea* as Anticancer on T47D Breast Cancer Cell Lines. *Alchemy*; 5(1):1–4.
- [8] Mutiah R., Widyawaruyanti A., Sukardiman S. 2017. Cytotoxic effect of crude extract and fraction from *Calotropis gigantea* leaves on human colon cancer widr cell lines.*International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (IJPPS)*, 9 (1). pp. 83-86.
- [9] Mutiah R. (2014). Pengembangan Fitofarmaka Antikanker “ Panduan Teknik Pengembangan Obat Herbal Indonesia Menjadi Fitofarmaka.Uin Maliki Press.ISBN: 978-602-1190-26-5.pp 50-70