

ARTIKEL PUBLIKASI ILMIAH



**UJI KOMBINASI EKSTRAK ETIL ASETAT DAUN
DEWANDARU (*Eugenia uniflora* L.) DAN DOXORUBICIN
TERHADAP PROLIFERASI SEL KANKER PAYUDARA T47D**

Oleh :

Ika Trisharyanti Dian Kusumowati, S.Si., M.Farm., Apt.

DIBIYAI OLEH KOORDINASI PERGURUAN TINGGI SWASTA WILAYAH VI
DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL REPUBLIK INDONESIA
SESUAI DENGAN SURAT PERJANJIAN PELAKSANAAN PENELITIAN
NOMOR : 008/O06.2/PP/SP/2010, TANGGAL 01 MARET 2010

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA
SEPTEMBER 2010**

Uji Kombinasi Ekstrak Etil Asetat Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) dan Doxorubicin Terhadap Proliferasi Sel Kanker Payudara T47D

Ika Trisharyanti Dian Kusumowati

Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta

INTISARI

Hasil berbagai penelitian menunjukkan bahwa kanker masih merupakan penyebab utama kematian di Indonesia maupun di dunia. Penggunaan kombinasi kemoterapi, penggunaan bersama senyawa kemoprevensi yang bersifat non-toksik atau lebih tidak toksik dengan agen kemoterapi, diketahui mampu meningkatkan sensitifitas sel kanker serta efikasi kemoterapi dengan penurunan toksisitas terhadap jaringan normal. Penelitian ini bertujuan mengetahui potensi kombinasi ekstrak etil asetat daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) dan Doxorubicin dalam menghambat proliferasi sel kanker payudara T47D secara *in vitro* dengan penentuan nilai *combination index*-nya.

Uji MTT digunakan untuk mengukur besarnya efek penghambatan sel T47D oleh doxorubicin dan ekstrak etil asetat daun dewandaru. Nilai IC₅₀ ekstrak etil asetat *E. uniflora* adalah 212,79 µg/ml yang berarti ekstrak tersebut memiliki efek sitotoksik yang kurang poten terhadap sel T47D, karena nilai IC₅₀ lebih besar dari 100 µg/ml. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya. Nilai IC₅₀ doxorubicin secara tunggal pada sel T47D yang diperoleh pada penelitian ini adalah 103,12 nM. Hasil ini berbeda dengan hasil penelitian sebelumnya yang menunjukkan nilai IC₅₀ doxorubicin sebesar 50 nM, di bawah 100 nM.

Efek kombinasi dox dan ekstrak etil asetat daun dewandaru pada sel T47D belum dapat ditetapkan karena kegagalan penentuan prosentase sel hidup dengan metode MTT.

Kata Kunci: *Eugenia uniflora* L., sel T47D, sitotoksik, MTT

ABSTRACT

Combination Effect of Eugenia uniflora L. Leaves Ethyl Acetat extract and Doxorubicin against T47D cell

Result from various study showed that cancer is still the major cause of death in Indonesia as well as in the world. Chemotherapy combination attracted high attention in recent years to cure cancer. This method combines between non-toxic or less toxic phytochemicals and chemotherapeutic agents to sensitize cancer cell. The aim to examine whether ethyl acetate extract of Eugenia uniflora

L. leaves synergizes the therapeutic potential of doxorubicin on breast cancer cell line T47D.

MTT assay was used to measure the effect of growth inhibitory of the ethyl acetate extract of Eugenia uniflora L. and doxorubicin. IC₅₀ of the ethyl acetate extract of Eugenia uniflora L. was 212,79 µg/ml. This result showed that the extract less potent against T47D. IC₅₀ of doxorubicin was 103,12 nM. This result was different with the previous study that dox had IC₅₀ 50 nM.

Combination effect of dox and ethyl acetate extract of Eugenia uniflora L. could not measured cause it could not measure procentation of life with MTT method.

Key words: Eugenia uniflora L., T47D cell, cytotoxic, MTT

PENDAHULUAN

Kanker merupakan pertumbuhan dan perkembangan sel yang tidak terkontrol yang terjadi di dalam tubuh. Penyakit ini merupakan salah satu penyebab angka kematian yang cukup tinggi. Kanker payudara termasuk jenis kanker yang paling sering diderita kaum wanita disamping kanker kulit dan merupakan penyebab kematian kedua setelah kanker paru. Kanker payudara menduduki peringkat kedua setelah kanker serviks di Indonesia dari tahun 1988 sampai 1991. Dari kasus kanker pada wanita Indonesia, pada tahun 1991 kasus kanker payudara mencapai 17,77% (Tjindarbumi dan Mangunkusumo, 2002).

Doxorubicin (Dox) adalah agen kemoterapi yang bersifat sitotoksik dan termasuk dalam kelompok antrasiklin serta mempunyai aktivitas antitumor spektrum luas melalui interkalasi pada DNA dan penghambatan DNA topoisomerase II (Rock and DeMichele, 2003). Meskipun Dox mempunyai aktivitas pada kanker payudara, tetapi penggunaannya masih terbatas karena toksisitas sistemik terutama immunosupresi dan toksisitas jantung (Wattanapitayakul *et al.*, 2005). Pengurangan dosis yang digunakan dapat mengurangi efek samping. Pengembangan kemoterapi dengan doxorubicin perlu dilakukan sehingga pengobatan lebih aman dan selektif.

Salah satu cara yang akhir-akhir ini digunakan adalah menggunakan terapi kombinasi. Tanaman obat yang tidak mempunyai toksisitas atau toksisitasnya kecil, dikombinasi dengan agen kemoterapi, agar lebih berkhasiat dan

meminimalkan efek toksiknya pada sel normal (Tyagi *et al.*, 2004). Berbagai tanaman obat yang mampu mencegah kanker atau mempunyai aktivitas antikanker, diteliti sebagai bahan untuk dikombinasikan dengan agen kemoterapi, untuk meningkatkan aktivitas antikankernya.

Alternatif lain adalah agen kemoterapi yang dikombinasikan dengan tanaman yang dapat menghambat aktivitas GST. Penyakit kanker sering menunjukkan aktivitas GST berlebihan. Pada banyak kasus ditemukan peningkatan GST kelas pi pada jaringan kanker payudara yang jauh lebih tinggi dibanding jaringan payudara normal pada pasien yang sama (Kelley *et al.*, 1994). Peningkatan berlebihan aktivitas enzim GST kelas tertentu mengakibatkan resistensi agen kemoterapi karena sebagian besar dimetabolisme melalui konjugasi glutation (GSH) yang dikatalisis oleh GST sehingga terjadi penurunan efektivitas agen kemoterapi tersebut. Namun apabila agen kemoterapi tersebut diberikan bersama-sama senyawa lain yang bersifat sebagai inhibitor GST, maka efektivitasnya akan meningkat. Sebagai contoh adalah indometasin, obat antiinflamasi yang juga bersifat sebagai inhibitor GST, jika dikombinasi dengan klorambusil, maka akan terjadi peningkatan efektivitas klorambusil pada terapi jenis kanker tertentu (Hayes and Pulford, 1995).

Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.), salah satu tumbuhan asli Indonesia, adalah tanaman yang hidup tersebar di pulau Jawa dan Sumatera (Hutapea, 1991). Dewandaru mengandung senyawa seperti sitronela, sineol, terpenin, sesquiterpen, vitamin C, saponin, flavonoid, tannin dan antosianin (Einbond, *et al.*, 2004). Penelitian terkait yang pernah dilakukan membuktikan bahwa ekstrak kloroform, etil asetat, dan etanol daun Dewandaru mampu menghambat aktivitas GST ginjal tikus dengan substrat CDNB dengan nilai IC_{50} berturut-turut adalah 376,26; 228,96; dan 180,05 $\mu\text{g/ml}$ (Utami, 2007). Aktivitas sitotoksik ekstrak kloroform dan etil asetat daun Dewandaru terhadap sel Hela memberikan IC_{50} berturut-turut adalah 244,92 dan 241,55 $\mu\text{g/ml}$ (Utami, 2007).

Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi kombinasi ekstrak etil asetat daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) dan

Doxorubicin dalam menghambat proliferasi sel kanker payudara T47D secara *in vitro* dengan penentuan nilai *combination index*-nya .

METODE PENELITIAN

Bahan

Serbuk daun Dewandaru, etil asetat, FBS, doxorubicin, tripsin, fungison, penstrep, RPMI, DMSO

Alat

Plate 96, flask, blue tip, yellow tip, rangkaian alat soxhlet, *waterbath, evaporator, LAF cabinet*, inkubator CO₂, mikro pipet, *ependorf*.

Jalannya Penelitian

1). Pembuatan ekstrak daun dewandaru

Serbuk daun Dewandaru (80 g) disokhletasi dengan etil asetat. Selanjutnya filtrat diambil melalui penyaringan dan diuapkan hingga diperoleh ekstrak kental etil asetat.

2). Uji Sitotoksisitas

Uji sitotoksisitas dengan metode MTT dilakukan pada plate 96 sumuran terhadap biakan sel yang diberi perlakuan sampel uji. Inkubasi di dalam inkubator dalam waktu 24 jam. Jumlah sel yang hidup dihitung dengan mengukur serapan dengan alat ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm. Hasil pengukuran serapan diplotkan kedalam grafik prosentase sel hidup versus konsentrasi senyawa uji selanjutnya dilakukan penghitungan IC₅₀. Uji dilakukan individual terhadap masing-masing sampel uji (ekstrak etil asetat daun dewandaru dengan konsentrasi 10-350 µg/mL dan doxorubicin (Dox) dengan konsentrasi 5-100 nM). Luaran tahap ini adalah penentuan IC₅₀ ekstrak etil asetat daun dewandaru dan agen kemoterapi (Dox).

3). Uji Kombinasi

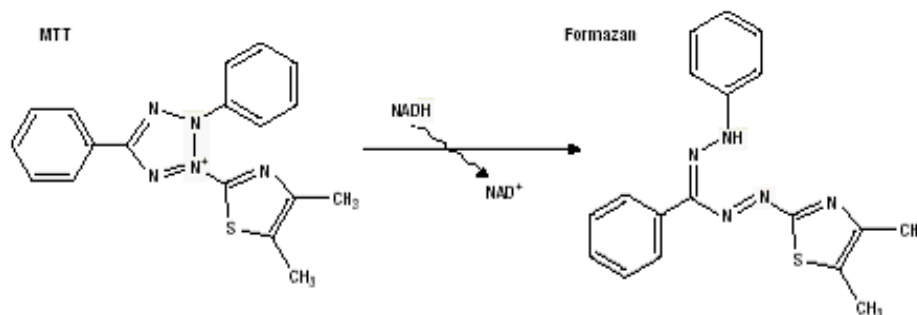
Dibuat seri konsentrasi sampel (ekstrak etil asetat daun dewandaru) dan agen kemoterapi (Dox) untuk perlakuan (termasuk kontrol sel). Seri konsentrasi terdiri dari 4 konsentrasi: IC₅₀, $\frac{3}{4}$ IC₅₀ , $\frac{1}{2}$ IC₅₀, dan $\frac{1}{4}$ IC₅₀.

Dilakukan uji sitotoksitas dengan metode MTT. Jumlah sel yang hidup dihitung dengan mengukur serapan dengan alat ELISA *reader* pada panjang gelombang 550 nm. Luaran penelitian ini adalah penentuan CI (*Combination index*) (Chou and Talalay, 1983).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Serbuk daun Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) sebanyak 80 gram diekstraksi dengan cara soxhletasi menggunakan pelarut etil asetat. Ekstrak etil asetat yang diperoleh sebanyak 26,98 gram (rendemen 33,73%).

Uji sitotoksitas dalam penelitian ini dilakukan dengan metode MTT. MTT [3-(4,5-dimetil thiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida] diabsorpsi oleh sel hidup dan direduksi oleh sistem reduktase suksinat tetrazolium yang ada dalam rantai respirasi mitokondria menjadi formazan berupa zat warna ungu yang tidak larut dalam air tetapi dapat larut dalam SDS 10% (Doyle and Griffiths, 2000). Sel hidup dapat mereduksi MTT, sedangkan sel mati tidak dapat mereduksi MTT. Formazan terlarut kemudian diukur serapannya dengan *Elisa Reader*. Serapan yang dihasilkan akan sebanding dengan jumlah sel hidup. Gambar 1 memperlihatkan reaksi reduksi MTT menjadi formazan.



Gambar 1. Reaksi Reduksi MTT Menjadi Formazan

Sampel uji pada uji sitotoksik ini dilarutkan dalam DMSO. DMSO dipilih sebagai pelarut karena telah dilaporkan bahwa penggunaan DMSO tidak berpengaruh pada proliferasi sel. Penggunaan DMSO sampai 1,25% v/v pada sel Hela dan sel Raji tidak berpengaruh terhadap proliferasi sel (Da'i, 2003). Uji

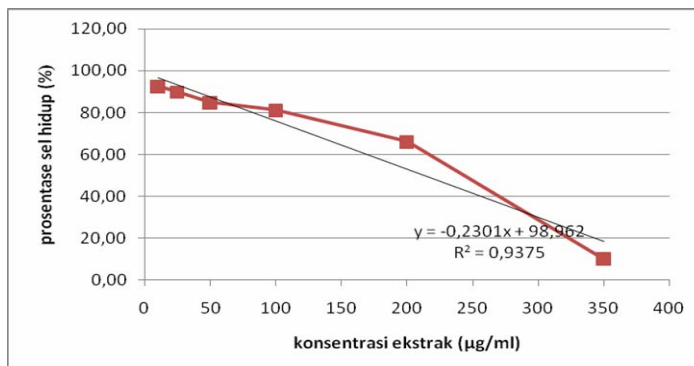
sitotoksisitas pada beberapa *cell line* termasuk sel kanker payudara MCF-7 dilaporkan tidak dipengaruhi oleh DMSO sampai konsentrasi 2% v/v (Ishida *et al.*, 2002). Penggunaan DMSO sampai 0,1% v/v dilaporkan tidak berkorelasi terhadap kematian sel T47D (Susanto, 2004).

Uji sitotoksik dilakukan terhadap ekstrak etil asetat *Eugenia uniflora* L. dan agen kemoterapi Doxorubicin (Dox). Uji sitotoksisitas digunakan untuk menentukan parameter nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai ini merupakan patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika proliferasi sel. Penentuan nilai IC₅₀ dilakukan dengan menggunakan analisis regresi linier yang didasarkan fungsi linier konsentrasi *versus* nilai prosentase sel hidup akibat perlakuan dengan sampel (Gambar 2 dan 3, dan Tabel 1 dan 2).

Nilai IC₅₀ ekstrak etil asetat *E. uniflora* adalah 212,79 µg/ml (Tabel 3) yang berarti ekstrak tersebut memiliki efek sitotoksik yang kurang poten terhadap sel T47D, karena nilai IC₅₀ lebih besar dari 100 µg/ml. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya. Aktivitas sitotoksik ekstrak kloroform dan etil asetat daun Dewandaru terhadap sel Hela memberikan IC₅₀ berturut-turut adalah 244,92 dan 241,55 µg/ml (Utami, 2007). Aktivitas yang rendah ini kemungkinan mengakibatkan ekstrak menjadi kurang poten jika digunakan sebagai antikanker secara tunggal. Alternatif penggunaan ekstrak tersebut sebagai antikanker adalah melalui kombinasi dengan agen kemoterapi seperti Doxorubicin.

Tabel 1. Hasil Uji Sitotoksik Ekstrak Etil asetat *E. uniflora* Terhadap Sel T47D Dengan Metode MTT

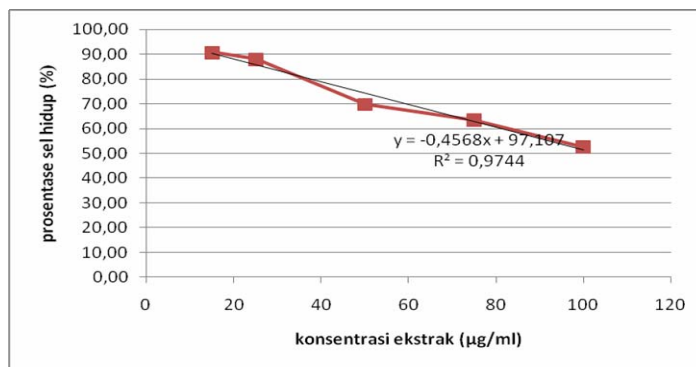
Konsentrasi ekstrak Etil asetat (µg/ml)	% Sel hidup
10	92,60
25	89,90
50	84,72
100	81,19
200	66,05
350	10,16



Gambar 2. Grafik prosentase sel T47D hidup pada perlakuan dengan Ekstrak Etil asetat *E. uniflora* (10-350 µg/ml). IC₅₀ ekstrak etil asetat dewandaru adalah 212,79 µg/ml.

Tabel 2. Hasil Uji Sitotoksik Doxorubicin Terhadap Sel T47D Dengan Metode MTT

Konsentrasi Doxorubicin (nM)	% Sel hidup
15	90,73
25	87,93
50	69,78
75	63,46
100	52,57



Gambar 3. Grafik prosentase sel T47D hidup pada perlakuan dengan Doxorubicin (15-100 µg/ml). IC₅₀ ekstrak etil asetat dewandaru adalah 103,12 nM.

Sel T47D merupakan sel yang sensitif terhadap Doxorubicin tetapi penggunaan Doxorubicin dalam klinik sangat dibatasi karena efek sampingnya

(Tyagi *et al.*, 2004). Nilai IC_{50} doxorubicin secara tunggal pada sel T47D yang diperoleh pada penelitian ini adalah 103,12 nM (Tabel 3). Hasil ini berbeda dengan hasil penelitian sebelumnya yang menunjukkan nilai IC_{50} doxorubicin sebesar 50 nM, di bawah 100 nM (Jenie dan Meiyanto, 2007).

Tabel 3. Nilai IC_{50} Ekstrak Etil asetat *E. uniflora*

Sampel	IC_{50}
Ekstrak etil asetat <i>E. uniflora</i>	212,79 μ g/ml
Doxorubicin	103,12 nM

Efek kombinasi dox dan ekstrak etil asetat daun dewandaru pada sel T47D ditetapkan pada uji kombinasi terhadap sel T47D untuk mengetahui apakah ada efek sinergis atau antagonis antara keduanya. Adanya efek sinergis antara masing-masing komponen dapat menaikkan efikasi sekaligus menurunkan efek samping yang tergantung dosis (Adams, *et al.*, 2006). Apabila ekstrak etil asetat *E. uniflora* L memiliki efek sinergis dengan Doxorubicin maka dosis Doxorubicin dapat diturunkan sehingga efek sampingnya dapat dikurangi. Efek kombinasi ekstrak etil asetat *E. uniflora* L dengan Doxorubicin belum dapat ditetapkan karena kegagalan uji akibat kontaminasi sel dan kegagalan penentuan prosentase sel hidup dengan metode MTT.

KESIMPULAN

1. Nilai IC_{50} ekstrak etil asetat *E. uniflora* adalah 212,79 μ g/ml, sedangkan nilai IC_{50} doxorubicin adalah 103,12 nM.
2. Efek kombinasi dox dan ekstrak etil asetat daun dewandaru pada sel T47D belum dapat ditetapkan.

UCAPAN TERIMA KASIH

1. Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, yang telah membiayai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, L.S., Seeram, N.P., Hardy, M.L., Carpenter, C., dan Heber, D., 2006, Analysis of the Interactions of Botanical Extract Combinations Against the Viability of Prostate Cancer Cell Lines, *eCAM*, 3(1) 117–124
- Chou, T. C., and Talalay, P., 1983, Analysis of Combined Drug Effects: A New Look at A Very Old Problem. *Trends Pharmacol. Sci.*, 4: 450–454.
- Da'i, M., 2003, Uji Aktivitas Antiproliferatif Pentagamavunon-O terhadap Sel Raji, Sel HeLa, dan Sel Myeloma, *Tesis*, Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta.
- Doyle, A., and Griffiths, J.B., 2000, *Cell and Tissue Culture for Medical Research*, John Willey and Sons Ltd, New York.
- Einbond, L., Reynertson, K.A., Luo, X. D., Basile, M.J., Kennely, E.J., 2004, Anthocyanin Antioxidants From Edible Fruits, *Food Chem.*, 84, 23-28.
- Hayes, J.D. and Pulford, D.J., 1995, The Glutathione S-transferases Supergene Family : Regulation of GST and The Contribution of The Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance, *Crit. Rev. in Biochem. and Mol. Biol.*, 30 (6), 445-600.
- Hutapea, J.R., 1991, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia III*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta
- Ishida, J., Ohtsu, H., Tachibana, Y., Nakanishi, Y., Bastow, K.F., Nagai, M., Wang, H., Itokawa, H., and Lee, K., 2002, Antitumor Agents, Part 214 : Synthesis and Evaluation of Curcumin Analogues as Cytotoxic Agents, *Bioorg & Med. Chem.*, 10, 3481-3487.
- Jenie, R.I., Meiyanto, E., 2007, Ko-kemoterapi Ekstrak Etanolik Daun Sambung Nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) dan Doxorubicin pada Sel Kanker Payudara, *Majalah Farmasi Indonesia*, 18 (2), 81-87.
- Kelley, M.K., Engqvist-Goldstein, A., Montali, J.A., Wheatly, J.B., Schmidt Jr., D.E., and Kauvar, L.M., 1994, Variability of Glutathione S-transferases Isoenzyme Patterns in Matched Normal and Cancer Human Breast Tissue, *Biochem. J.*, 304, 843-848.
- Rock, E., and DeMichele, A., 2003, Nutritional Approaches to Late Toxicities of Adjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Survivors, American Society for Nutritional Sciences, *J. Nutr.*, 133, 3785-3793.

- Susanto, A., 2004, Uji Daya Antiproliferasi Pentagamavunon-O terhadap Sel Kanker Payudara T47D, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Tjindarbumi, D., dan Mangunkusumo, R., 2002, Cancer In Indonesia, Present and Future, *Jpn J Clin Oncol.*, 32 (Supplement 1), S17-S21.
- Tyagi, A.K., Agarwal, C., Chan, D.C.F., and Agarwal, R., 2004, Synergistic Anti-Cancer Effects of Silibinin with Conventional Cytotoxic Agents Doxorubicin, Cisplatin and Carboplatin against Human Breast Carcinoma MCF-7 and MDA-MB468 Cells, *Oncology Reports*, 11, 493-499.
- Utami, W., 2007, Pengaruh Ekstrak Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) terhadap Aktivitas Glutathion S-Transferase Ginjal Tikus secara In Vitro dengan Substrat 1-Kloro-2,4-Dinitrobenzen, *Laporan Penelitian Reguler LP2M UMS*, Universitas Muhamadiyah Surakarta, Surakarta.
- Wattanapitayakul, S.K., Chularojmontri, L., Herunsalee, A., Charuchongkolwongse, S., Niumsukul, S., and Bauer, J.A., 2005, Screening of Antioxidants from Medicinal Plants for Cardioprotective Effect against Doxorubicin Toxicity, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, vol. 96, 80.