

POTENSI SITOTOKSIK TANAMAN CEPLUKAN (*Physalis angulata* L) TERHADAP SEL HeLa

CYTOTOXIC EFFECTS OF *Physallis angulata* PLANT On HeLa CELL LINE

Maryati dan EM Sutrisna

Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta

ABSTRAKSI

Hasil berbagai penelitian menunjukkan bahwa kanker masih merupakan penyebab utama kematian di Indonesia maupun di dunia. Oleh karena itu penelitian untuk menemukan obat kanker baru perlu terus dikembangkan. Salah satu tanaman yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai alternatif pengobatan kanker adalah tanaman Ceplukan (*Physallis angulata* L). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksik tanaman *P. angulata* dan pengaruhnya terhadap proliferasi (pertumbuhan) sel HeLa. Serbuk tanaman *P. angulata* disari dengan etanol sehingga diperoleh ekstrak etanol. Ekstrak etanol selanjutnya difraksinasi dengan petroleum eter, kloroform dan etil asetat. Uji sitotoksik dilakukan dengan metode MTT, dilanjutkan pengamatan penghambatan proliferasi sel HeLa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol, fraksi petroleum eter, fraksi kloroform dan fraksi etil asetat mempunyai efek sitotoksik yang kurang poten terhadap sel HeLa dengan nilai IC_{50} berturut-turut 316,23 $\mu\text{g/ml}$, 120,198 $\mu\text{g/ml}$, 151,89 $\mu\text{g/ml}$ dan 461,64 $\mu\text{g/ml}$. Ekstrak etanol, fraksi petroleum eter, fraksi kloroform dan fraksi etil asetat tanaman *P. angulata* mampu menghambat proliferasi sel HeLa.

Kata kunci: *Physallis angulata*, sel HeLa, sitotoksik, MTT

ABSTRACT

Result from various study showed that cancer is still the major cause of death in Indonesia as well as in the world. Therefore, research to develop new cancer drug is important. Ceplukan (*Physallis angulata* L.) is one of the potential plant that can be developed as cancer chemoprevention agent. The aim of this research was to examine the cytotoxic effect of *Physallis angulata* (L.) extract and the fraction and to study the effect on proliferation of HeLa cells. *Physallis angulata* L extract was fractionation with petroleum eter, kloroform and ethyl acetate. The cytotoxic effect of *Physallis angulata* (L.) extract and fractions determine using MTT method against Myeloma cells, follow by observation on the proliferation of HeLa cells. Results showed that ethanol extract, petroleum eter fraction, kloroform fraction, ethyl acetate fraction of *Physallis angulata* had cytotoxic effects (less potent) on HeLa cells with IC_{50} 316.23 $\mu\text{g/ml}$, 120.198 $\mu\text{g/ml}$, 151.89 $\mu\text{g/ml}$ and 461.64 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Ethanol extract, petroleum eter fraction, chloroform fraction, ethyl acetate fraction of *Physallis angulata* had inhibitory effect on proliferation of HeLa cells.

Key words: *Physallis angulata*, HeLa cells, cytotoxic, MTT

PENDAHULUAN

Salah satu usaha yang dapat ditempuh untuk menemukan obat kanker adalah menggali sumber obat nabati. Indonesia kaya akan sumber bahan obat alam nabati yang telah dimanfaatkan secara turun-temurun oleh masyarakat, termasuk untuk mengobati kanker (Anonim^a, 2003). Salah satu tanaman yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat antikanker adalah tanaman Ceplukan atau *Physallis angulata*. Biji tanaman ceplukan mengandung 12-25% protein, 15-40% asam palmitat dan asam stearat (Sudarsono, dkk., 2002). Daun tanaman ceplukan mengandung glikosida flavonoid (luteolin), mirisetin 3-O-neohesperidosida (Ismail & Alam, 2001),

sedangkan tunasnya mengandung flavonoid dan saponin (Sudarsono, dkk., 2002). Dari beberapa kandungan tersebut kemungkinan ada senyawa yang memiliki efek antiproliferatif terhadap sel kanker.

Penelitian-penelitian terdahulu telah membuktikan bahwa ekstrak *P. angulata* memiliki aktivitas imunomodulator (Lin *et al.*, 1992), ekstrak etanol *P. angulata* juga memiliki aktivitas sitotoksik terhadap beberapa *cell line* seperti HA22T, KB, Colo 205 dan Calu. (Chiang *et al.*, 1992). Ekstrak etanol tanaman *P. angulata* menginduksi G2/M arrest dan menginduksi apoptosis pada *human breast cancer* MAD-MD 231 dan MCF-7 *cell line* (Hsieh *et al.*, 2006).

Pada penelitian ini akan dilakukan uji sitotoksik ekstrak etanol 96%, fraksi petroleum eter, fraksi kloroform dan fraksi etil asetat tanaman Ceplukan (*Physalis angulata* L) terhadap sel HeLa serta pengamatan penghambatan proliferasi terhadap sel HeLa.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan utama: buah tanaman Ceplukan yang berasal Gantiwarno, Klaten dan sel HeLa diambil dari Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran UGM.

Bahan kimia: etanol 96 %, PE, kloroform dan etil asetat (Kualitas PA), RPMI (*Rosewell Park Memorial Institute*) 1640 (Gibco), FBS (*Fetal Bovine Serum*) 10 % v/v (Gibco), fungizone, larutan penicillin-streptomisin, DMSO sebagai pelarut ekstrak, SDS 10 % (Sigma) dalam HCL 0,01 N (Merk), MTT (Sigma).

Alat: Alat untuk Soxhletasi, microplate 96 sumuran steril (Nunclon), tabung conical steril (Nunclon), *Laminair Air Flow* (German Sciences), sentrifuge (Sorvall), haemocytometer (Marienfeld), ELISA reader (SLT 240 ATC), mikroskop fase kontras (Olympus), tangki nitrogen cair, inkubator CO₂ (NuairTM IR autoflow), *tissue culture flask* (Nunclone), mikropipet (Gilson), vorteks (Genie), timbangan elektrik (Sartorius), kamera digital Canon power Shoot A 40, 4,0 mega pixels).

Jalan Penelitian

Ekstraksi

Serbuk sebanyak dua kilogram disoxhletasi dengan pelarut etanol 96%. Ekstrak diktakkan dengan menggunakan evaporator, dilanjutkan dengan penangas air. Ekstrak yang diperoleh kemudian difraksinasi dengan cara dipartisi cair-cair dengan petroleum eter, kloroform, dan etil asetat. Fraksinasi dilakukan dengan cara ekstrak dilarutkan dengan air panas kemudian diekstraksi dengan petroleum eter beberapa kali sampai lapisan petroleum eter bening. Lapisan petroleum eter dipisahkan dari lapisan air, kemudian diuapkan dengan evaporator sampai diperoleh masa kental, sehingga diperoleh fraksi petroleum eter. Lapisan air selanjutnya dipartisi dengan kloroform beberapa kali sampai lapisan kloroform bening. Lapisan kloroform dipisahkan dari lapisan air, kemudian diuapkan dengan evaporator sampai diperoleh masa kental, sehingga diperoleh fraksi kloroform. Lapisan air selanjutnya dipartisi dengan etil asetat beberapa kali sampai lapisan etil asetat bening. Lapisan etil asetat dipisahkan dari lapisan air, kemudian diuapkan dengan evaporator sampai diperoleh

masa kental, sehingga diperoleh fraksi etil asetat. Penelitian selanjutnya dilakukan terhadap ekstrak etanol 96% dan fraksi-fraksi ini dan tanaman *Physalis angulata* L.

Uji sitotoksik

Suspensi sel dalam medium PRF RPMI 1640 sebanyak 100 µl (kepadatan 2,0 X 10⁴ sel/sumuran) dimasukkan ke dalam *plate* 96 dan *plate* diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO₂ 5%. Kemudian ditambahkan sampel 100 µl dalam medium pada tiap sumuran yang berbeda sehingga diperoleh kadar akhir sampel dengan variasi kadar tertentu (sampel: 31,25; 62,5; 125; 250; 500 µg/ml). Selanjutnya *plate* diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% selama 24 jam pada suhu 37° C. Pada akhir inkubasi, medium pada masing-masing sumuran dibuang dengan hati-hati, kemudian dicuci dengan PBS. Selanjutnya ditambahkan 100 µl medium baru dan 15 µl MTT 0,5 % dalam PBS. *Plate* diinkubasi lagi selama 4 jam pada suhu 37° C. Sel hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formazan yang berwarna ungu. Formazan dilarutkan dalam larutan SDS, lalu diinkubasi selama semalam pada suhu kamar. Pada akhir masa inkubasi serapan dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 550 nm. Persentase sel hidup dihitung dari data absorbansi sel, kemudian dibuat kurva hubungan log konsentrasi versus % sel hidup dan dihitung harga IC₅₀nya.

Uji pengamatan penghambatan proliferasi

Seperti halnya uji sitotoksik tetapi digunakan sampel pada konsentrasi yang tidak mematahkan (di bawah nilai IC₅₀), pengamatan dilakukan pada jam 24, 48 dan 72.

Cara Analisis

Uji Sitotoksik

Data yang diperoleh berupa absorbansi. Data ini untuk menghitung prosentase penghambatan pertumbuhan sel HeLa. Perhitungan dilakukan dengan rumus:

$$\% \text{ sel hidup} = (\text{abs p} - \text{abs m}) / (\text{abs k} - \text{abs m}) \times 100\%$$

abs p : absorbansi perlakuan

abs k : absorbansi kontrol sel

abs m : absorbansi medium

Kemudian dilanjutkan analisis statistik dengan uji kolerasi menggunakan metode probit melalui tabel, selanjutnya dibuat persamaan garis regresi $Y = BX + A$, dengan Y adalah angka probit dan X adalah log konsentrasi. Nilai probit 5 (50 % sel hidup) dimasukkan ke dalam persamaan sehingga diperoleh harga IC₅₀.

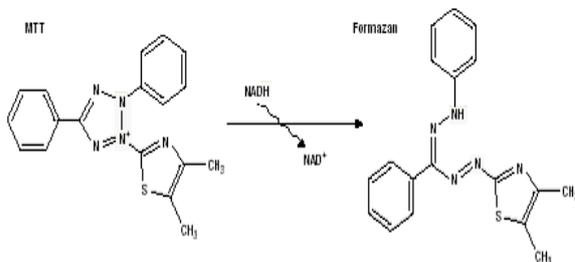
Uji pengamatan kinetika proliferasi

Data yang didapat dianalisis statistik dengan uji korelasi waktu pengamatan *versus* jumlah sel hidup untuk menentukan persamaan garis regresi dan dilakukan uji t untuk menentukan signifikansi dari masing-masing data absorbansi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Serbuk tanaman *Physalis angulata*, L sebanyak 250 gram diekstraksi dengan cara Soxhletasi menggunakan pelarut etanol 96%. Soxhletasi dilakukan delapan kali sehingga total serbuk yang disoxhletasi adalah 2 kg. Ekstrak etanol yang diperoleh kurang lebih sebanyak 196,54 gram. Karena etanol merupakan pelarut yang universal maka dalam ekstrak etanol ini terekstraksi banyak senyawa. Untuk memisahkan senyawa-senyawa tersebut (berdasarkan kepolarannya) dilakukan partisi cair-cair dengan petroleum eter, kemudian dipartisi dengan kloroform dan terakhir dipartisi dengan etil asetat. Dari hasil fraksinasi tersebut diperoleh fraksi petroleum eter sebanyak 71,34 g fraksi kloroform sebanyak 22,17 g dan fraksi etil asetat sebanyak 8,10 g.

Dalam penelitian ini uji sitotoksitas dilakukan dengan metode MTT. Senyawa MTT [3-(4,5-dimetilthiazol-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 (Gambar 1). 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

Dalam uji sitotoksik ini sampel dilarutkan dalam DMSO. DMSO dipilih sebagai pelarut karena telah dilaporkan bahwa penggunaan DMSO tidak berpengaruh pada proliferasi sel. Penggunaan DMSO dilaporkan relatif tidak berpengaruh terhadap proliferasi sel. Nurroch-

mad (2001) membuktikan konsentrasi DMSO sampai 4 % v/v tidak mengganggu proliferasi sel HeLa.

Uji sitotoksik dilakukan terhadap ekstrak etanol *Physalis angulata*, L, fraksi petroleum eter, fraksi kloroform, dan fraksi etil asetat. Penentuan nilai IC₅₀ dilakukan dengan menggunakan analisis probit yang didasarkan pada grafik fungsi linier log konsentrasi *versus* nilai probit dari persentase sel hidup akibat perlakuan dengan sampel (Gambar 2, 3, 4 dan 5) (Tabel 1).

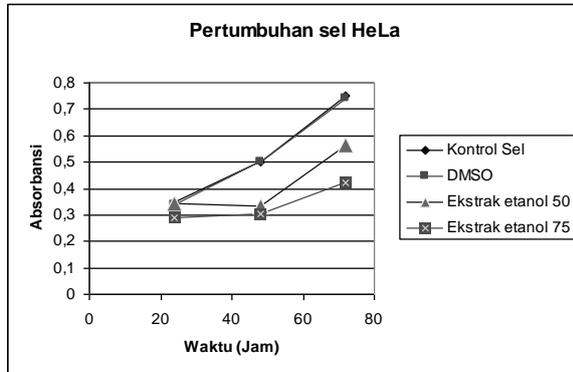
Tabel 1—Nilai IC₅₀ ekstrak etanol, fraksi petroleum eter, fraksi kloroform dan fraksi etil asetat tanaman *Physalis angulata*, L

Sampel	IC ₅₀ (µg/ml)
Ekstrak etanol	316,23
Fraksi petroleum eter	120,19
Fraksi kloroform	151,89
Fraksi etil asetat	461,64

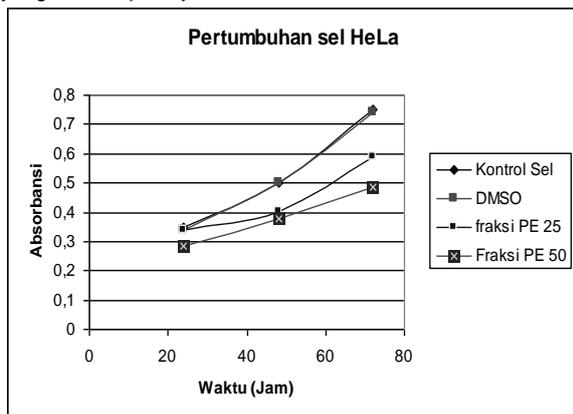
Hasil menunjukkan bahwa semua sampel yang diuji memiliki efek sitotoksik yang kurang poten terhadap sel HeLa, karena semua sampel mempunyai nilai IC₅₀ yang lebih besar dari 100 µg/ml. Dari empat sampel yang diuji, fraksi petroleum eter memiliki nilai IC₅₀ yang paling kecil yaitu 120,19 µg/ml (Tabel 1). Sebelumnya pernah dilakukan penelitian efek sitotoksik tanaman *P. Angulata* terhadap sel kanker payudara MCF7 (Sutrisna, 2006) dan terhadap sel Myeloma (Maryati dan Sutrisna, 2007). Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol *P. Angulata* mempunyai efek sitotoksik yang poten terhadap sel MCF7 (IC₅₀ = 31,53 µg/ml) dan terhadap sel Myeloma mempunyai IC₅₀ 70,92 µg/ml. Dari data-data di atas sementara bisa disimpulkan bahwa tanaman ceplukan lebih berefek pada sel kanker payudara dan sel kanker Myeloma dari pada terhadap sel HeLa (sel kanker *cervic*). Selanjutnya dilakukan uji pengamatan penghambatan pertumbuhan sel HeLa akibat perlakuan dengan sampel.

Uji pengamatan penghambatan pertumbuhan sel HeLa dilakukan untuk mengamati dengan jelas efek ekstrak etanol dan fraksi-fraksi dari tanaman *Physalis angulata*, L terhadap waktu penggandaan sel HeLa. Senyawa yang dapat menunda waktu penggandaan sel, diduga dapat menghambat gen-gen atau protein yang mengatur *cell cycle*. Konsentrasi senyawa uji yang digunakan adalah 2 konsentrasi di bawah nilai IC₅₀, agar sel tidak terlalu banyak yang mati pada pengamatan selama 72 jam akibat sifat sitotoksik senyawa uji. Pada uji pengamatan kinetika proliferasi sel ini digunakan konsentrasi ekstrak etanol 50 dan 75 µg/ml, konsentrasi fraksi petroleum eter 25 dan 50 µg/ml, konsentrasi fraksi kloroform 10 dan 25

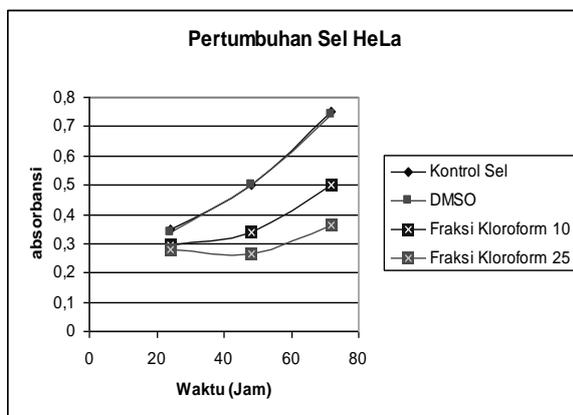
µg/ml dan konsentrasi fraksi etil asetat 50 dan 100 µg/ml. Uji ini juga dilakukan dengan metode MTT. Pengamatan dilakukan pada jam ke 24, 48 dan 72 (Gambar 2, 3, 4, 5). Pada uji ini absorbansi menggambarkan banyaknya sel hidup.



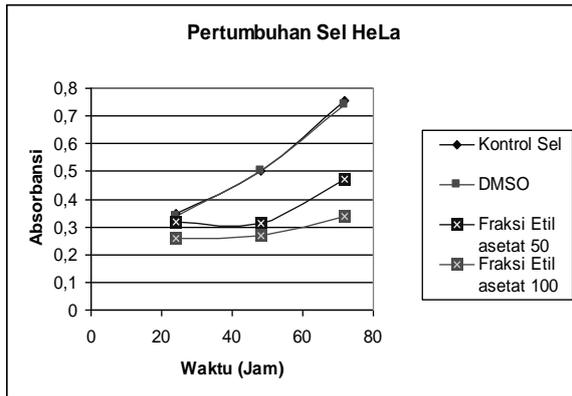
Gambar 2—Profil pertumbuhan Sel HeLa akibat perlakuan ekstra *P. angulata* L. konsentrasi 50 µg/ml dan 75 µg/ml yang diamati pada jam ke-24, 48 dan 72



Gambar 3—Profil pertumbuhan sel HeLa akibat perlakuan fraksi petroleum eter ekstrak etanolik *P. angulata* L. Konsentrasi 25 µg/ml dan 50 µg/ml yang diamati pada jam ke-24, 48 dan 72



Gambar 4— Profil pertumbuhan sel HeLa akibat perlakuan fraksi kloroform ekstrak etanolik *P. angulata* L. Konsentrasi 10 µg/ml dan 25 µg/ml yang diamati pada jam ke-24, 48 dan 72.



Gambar 5—Profil pertumbuhan sel HeLa akibat perlakuan fraksi etil asetat ekstrak etanolik *P. angulata* L. Konsentrasi 10 µg/ml dan 25 µg/ml yang diamati pada jam ke-24, 48 dan 72.

Tabel 2—Persamaan regresi linier pada pengamatan penghambatan pertumbuhan Sel HeLa akibat perlakuan dengan ekstrak etanol *Physallis angulata*

Perlakuan	Persamaan regresi linier	Slope
Kontrol sel	$Y = 0,0083X + 0,1423$	0,0083
DMSO	$Y = 0,0084X + 0,124$	0,0084
Ekstrak etanol 50 µg/ml	$Y = 0,0046X + 0,194$	0,0046
Ekstrak etanol 75 µg/ml	$Y = 0,0028X + 0,2077$	0,0028

Tabel 3—Persamaan regresi linier pada pengamatan penghambatan pertumbuhan sel HeLa akibat perlakuan dengan fraksi petroleum eter ekstrak etanol *Physallis angulata*

Perlakuan	Persamaan regresi linier	Slope
Kontrol sel	$Y = 0,0083x + 0,142$	0,0083
DMSO	$Y = 0,0068x + 0,2153$	0,0068
Fraksi PEi 25 µg/ml	$Y = 0,0052x + 0,1957$	0,0052
Fraksi PE 50 µg/ml	$Y = 0,0042x + 0,1817$	0,0042

Tabel 4—Persamaan regresi linier pada pengamatan penghambatan pertumbuhan sel HeLa akibat perlakuan dengan fraksi kloroform ekstrak etanolik *Physallis angulata*

Perlakuan	Persamaan regresi linier	Slope
Kontrol sel	$Y = 0,083X + 0,1417$	0,0083
DMSO	$Y = 0,008X + 0,1351$	0,008
Fraksi Kloroform 10 µg/ml	$Y = 0,0043X + 0,1749$	0,0043
Fraksi Kloroform 25 µg/ml	$Y = 0,0017X + 0,2238$	0,0017

Tabel 5—Persamaan regresi linier pada pengamatan penghambatan pertumbuhan sel HeLa akibat perlakuan dengan fraksi etil asetat ekstrak etanolik *Physallis angulata*

Perlakuan	Persamaan regresi linier	Slope
Kontrol sel	$Y = 0,0083x + 0,1423$	0,0083
DMSO	$Y = 0,008x + 0,136$	0,008
Fraksi etil asetat 50 µg/ml	$Y = 0,0032x + 0,2143$	0,0032
Fraksi etil asetat 100 µg/ml	$Y = 0,0017x + 0,2087$	0,0017

Hasil uji t (data tidak ditampilkan) memperlihatkan pada semua sampel, pada kedua konsentrasi mulai pengamatan jam ke 48 sampai jam ke 72 menunjukkan absorbansi yang signifikan dibandingkan kontrol. Absorbansi yang diperoleh kemudian dibuat kurva hubungan antara waktu (jam) dengan absorbansi. Dari persamaan regresi linier yang diperoleh, dengan melihat nilai slope dapat diketahui efek penghambatan proliferasinya. Efek penghambatan sampel terhadap proliferasi sel berbanding lurus dengan konsentrasinya (Gambar 2, 3, 4, dan 5). Semakin besar konsentrasi sampel semakin besar pula efek penghambatan terhadap pertumbuhan sel HeLa. Dapat dikatakan bahwa efek penghambatan proliferasi sel dari sampel-sampel tersebut bersifat dependent dose.

Hasil memperlihatkan bahwa semua sampel (ekstrak etanol, fraksi petroleum eter, fraksi kloroform dan fraksi etil asetat tanaman *P. Angulata*) pada kedua konsentrasi yang diuji mampu menghambat proliferasi sel HeLa (Tabel 2, 3, 4 dan 5). Hal itu terlihat dari nilai

slope persamaan regresi linier pada semua sampel yang lebih kecil dibandingkan kontrol sel tanpa perlakuan. Data-data di atas menunjukkan bahwa perlakuan dengan semua sampel tidak menghentikan *cell cycle*, tetapi kemungkinan hanya menyebabkan *cell cycle arrest* sehingga akan menghambat proliferasi sel.

KESIMPULAN

1. Ekstrak etanolik, fraksi petroleum eter, fraksi kloroform dan fraksi etil asetat tanaman *P. Angulata* memiliki efek sitotoksik yang kurang poten terhadap sel HeLa dengan IC50 berturut-turut 316,23 µg/ml, 120,198 µg/ml, 151,89 µg/ml dan 461,64 µg/ml.
2. Ekstrak etanolik, fraksi petroleum eter, fraksi kloroform dan fraksi etil asetat tanaman *P. Angulata* mampu menghambat proliferasi (pertumbuhan) sel HeLa.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian tanaman *P. Angulata* terhadap sel kanker yang lain.

DAFTAR ACUAN

- Anonim, 2003, Beberapa Tanaman yang Berkhasiat Sebagai Antikanker, *InfoPOM*, 4(6): 1–3
- Chiang, H. C., Jaw, S.M., Chen, C.F., Kan, W.s., 1992, Antitumor agent from *Physalis angulata* L., *Anticancer Res*, 12(3):837
- Hsieh, W.T., Huang, K.Y., Lin, H.Y., Chung, J, G., 2006, *Physalis angulata* induced G2/M phase arrest in human breast cancer cells, *Food and chemical toxicology*
- Ismail, N., and Alam, M., 2001, A novel cytotoxic flavonoid glycoside from *Physalis angulata*, *Fitoterapi*, vol. 72, 676–679
- Lin, Y.S., Chiang, H.C., Kam, W.S., Shih, S.L., and Won, M.H., 1992, Immunomodulatory activity of Various fractions derived from *Physalis angulata* L extract, *Aim J Chin Med*, 20(3-4):233–243
- Sударsono, Gunawan, D., Wahyono, S., Donatus, I.A., 2002, *Tumbuhan Obat II*, Hasil Penelitian, Sifat-sifat dan Penggunaan, Pusat Studi Obat Tradisional UGM, 147–150