

**EFEK SITOTOKSIK DAN PEMACUAN APOPTOSIS FRAKSI
PETROLEUM ETER EKSTRAK ETANOL DAUN TAPAK LIMAN
(*Elephantopus scaber* Linn) TERHADAP SEL HELA**

**CYTOTOXIC AND APOPTOSIS INDUCTION EFFECT OF
PETROLEUM ETHER FRACTION OF TAPAK LIMAN
(*Elephantopus scaber* Linn) ETHANOLIC EXTRACT
ON HELA CELLS**

Yeni Listyowati, Nurkhasanah

Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan

Jl. Prof. Dr. Soepomo, Janturan, Yogyakarta

Email : nurkhas@gmail.com

Abstrak

Tapak liman telah dilaporkan mempunyai efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara dan potensial untuk dikembangkan sebagai antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik dan pemacuan apoptosis fraksi petroleum eter ekstrak etanol daun tapak liman (*Elephantopus scaber* Linn) terhadap sel kanker leher rahim (Hela). Fraksi petroleum eter diperoleh dengan melarutkan sejumlah ekstrak kental pada petroleum eter, dan bagian yang larut disebut sebagai fraksi petroleum eter. Metode yang digunakan pada uji aktivitas sitotoksik terhadap sel Hela adalah MTT test. Seri kadar fraksi petroleum eter yang digunakan terhadap sel Hela adalah 2000; 1500; 1000; 800; 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 dan 3,125 $\mu\text{g/ml}$. Parameter sitotoksitas yang digunakan adalah IC_{50} . Pengamatan apoptosis dilakukan dengan metode akridine orange dan ethidium bromide. Harga IC_{50} fraksi petroleum eter ekstrak etanol daun tapak liman (*Elephantopus scaber* Linn) adalah 185 $\mu\text{g/ml}$. Fraksi petroleum eter ekstrak etanol daun tapak liman (*Elephantopus scaber* Linn) menunjukkan dapat memacu apoptosis.

Kata kunci : *Elephantopus scaber* Linn, Sitotoksitas, Apoptosis, Sel Hela

Abstract

Elephantopus scaber Linn. has been reported to have cytotoxic effects on breast cancer cells and the potential to be developed as anticancer agent. This study aims was to determine the cytotoxic activity and apoptosis induction effect of petroleum ether fractions of ethanolic extract of (*Elephantopus scaber* Linn) leaves against cervical cancer cells (HeLa). Petroleum ether fraction was obtained by dissolving ethanolic extract in petroleum ether, and the soluble fraction was as petroleum ether fraction. The method used for cytotoxic activity test was MTT test. The concentration series used were 2000; 1500; 1000; 800; 400; 200; 100; 50; 25; 12.5; 6.25 and 3.125 mg/ml. The IC_{50} used as cytotoxic parameters. The apoptotic observations was conducted using acridine orange and ethidium bromide. The study showed the IC_{50} of petroleum ether fraction of (*Elephantopus scaber* Linn) ethanolic extract was 185 μ g/ml. The study also showed the potency to stimulate apoptosis in HeLa cells.

Keywords : *Elephantopus scaber* Linn, cytotoxicity, apoptosis, HeLa cells

PENDAHULUAN

Kanker leher rahim atau serviks adalah penyakit yang disebabkan oleh proses keganasan yang terjadi pada serviks atau mulut rahim. Penyebab kanker leher rahim belum diketahui secara pasti, namun diduga sekitar 95% disebabkan oleh *Human Papilloma Virus (HPV)* (Canava dan Doshi, 2000). Kanker leher rahim menempati urutan ketujuh dalam kasus kanker secara keseluruhan dan menempati urutan kedua kanker pada wanita setelah kanker payudara (Parkin, 2001).

Pengobatan kanker pada umumnya sama, yaitu salah satu atau kombinasi dari pembedahan, penyinaran (radioterapi), kemoterapi (sitostatik), peningkatan daya tahan tubuh dan pengobatan dengan hormon (Apantaku, 2002). Pembedahan tidak dapat dilakukan pada kanker stadium lanjut khususnya pada sel kanker yang sudah bermetastatis. Kemoterapi dapat menjadi salah satu alternatif pengendalian penyakit kanker, meskipun demikian kemoterapi memiliki efek samping dan toksisitas yang tinggi (Mutschler, 1991; Gibbs, 2000). Kegagalan kemoterapi dapat berkaitan dengan kegagalan agen antikanker untuk memengaruhi kematian sel secara terpro gram (apoptosis) (Fisher, 1994).

Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai antikanker yaitu tapak liman (*Elephantopus scaber* Linn). Penelitian oleh Ho et al (2009) menunjukkan bahwa ekstrak etanol tapak liman (*Elephantopus scaber* Linn) menunjukkan efek sitotoksik pada sel MCF-7 dengan nilai IC_{50} 15 μ g/ml. Penelitian dari Geetha et al (2011) juga menyebutkan bahwa isolat ekstrak kloroform tapak liman (*Elephantopus scaber* Linn) dapat sebagai antiproliferasi terhadap sel CaCo dengan nilai IC_{50} 2,7 μ g/ml dan 3,3 μ g/ml dan sesquiterpen lakton merupakan senyawa dari

Elephantopus scaber Linn yang berperan sebagai antikanker.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya efek sitotoksik dan pemacuan apoptosis dari fraksi petroleum eter ekstrak etanol daun tapak liman (*Elephantopus scaber* Linn) terhadap sel Hela secara invitro. Hasil penelitian ini diharapkan dapat mengembangkan tapak liman (*Elephantopus scaber* Linn) sebagai antikanker khususnya kanker serviks.

METODE PENELITIAN

Bahan

Daun tapak liman yang digunakan diambil dari desa Sayutan kecamatan Parang kabupaten Ponorogo, Jawa Timur. Subyek uji sitotoksitas ini adalah sel Hela yang diperoleh dari LPPT UGM.

Prosedur kerja

1. Ekstraksi dan Fraksinasi

Daun tapak liman yang telah dipetik dibersihkan dengan air mengalir dan dikeringkan dengan sinar matahari secara tidak langsung, kemudian dikeringkan kembali dengan oven. Daun tapak liman yang telah dikeringkan dibuat serbuk dengan cara diayak dengan ayakan no mesh 20/40. Serbuk yang lolos mesh 20 dan tidak lolos mesh 40 yang digunakan untuk ekstraksi.

Serbuk tapak liman (*Elephantopus scaber* Linn) ditimbang 200 gram, kemudian dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70% sebanyak 900 ml. Cairan penyari yang diperoleh dikumpulkan dan diuapkan dengan rotary evaporator. Ekstrak kental yang diperoleh ditimbang sebanyak 20 gram dilarutkan dalam Petroleum eter 100 ml kemudian

digojok dan shaker selama 6 jam. Setelah dishaker ekstrak didiamkan semalam kemudian dituang enap dan disaring diperoleh sari petroleum eter. Hasil sari petroleum eter yang diperoleh diuapkan di dalam lemari asam samapi diperoleh hasil fraksi petroleum eter yang pekat dan kental.

2. Pembuatan Larutan Uji

Larutan stok sampel dengan cara mencampurkan fraksi petroleum eter ekstrak etanol tapak liman (*Elephantopus scaber* Linn) sebanyak 10 mg kemudian ditambah 50 µl DMSO dan ditambahkan dengan media komp lit hingga 1000 µl, sehingga konsentrasi larutan uji menjadi 10.000 µg/ml. Dari konsentrasi tersebut dibuat seri kadar dan larutan dalam berbagai kadar tersebut dapat diujikan pada sel Hela. Seri kadar larutan uji yaitu 2000 µg/ml; 1500 µg/ml; 1000 µg/ml; 800 µg/ml; 400 µg/ml; 200 µg/ml; 100 µg/ml; 50 µg/ml; 25 µg/ml; 12,5 µg/ml; 6,25 µg/ml; 3,125 µg/ml. Pembuatan larutan uji ini dilakukan di dalam *LAF Cabinet* secara aseptis.

3. Uji Sitotoksik dengan MTT

Uji sitotoksik dilakukan dengan cara sel yang telah dikultur dipanen, kemudian sel Hela dimasukkan dalam sumuran *plate 96-well* dengan kepadatan sel Hela 10^4 sel/ml. Uji sitotoksik dilakukan dengan metode MTT. Larutan uji dibuat dengan seri kadar 2000 µg/ml; 1500 µg/ml; 1000 µg/ml; 800 µg/ml; 400 µg/ml; 200 µg/ml; 100 µg/ml; 50 µg/ml; 25 µg/ml; 12,5 µg/ml; 6,25 µg/ml; 3,125 µg/ml dan dibuat kontrol sel, kontrol media serta kontrol pelarut DMSO. Sel didistribusikan ke dalam 96 sumuran dan diinkubasi bersama ekstrak uji selama 24 jam. Pada masing-masing sumuran ditambah 100 µl MTT 5mg/ml PBS. Selanjutnya diinkubasi lagi 4 jam pada suhu 37° C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu. Reaksi MTT dihentikan dengan SDS 10% (*reagen stopper*), lalu diinkubasi semalam pada suhu kamar. Serapan dibaca pada ELISA *reader* pada panjang gelombang 550 nm.

4. Apoptosis

Pengamatan apoptosis pada penelitian ini dilakukan dengan pengecatan acridin-orange. Kadar sampel untuk apoptosis yaitu 370 µg/ml; 185 µg/ml dan 92,5 µg/ml. Sel Hela ditanam pada *coverslips* yang dimasukkan dalam microplate 24 sumuran sehingga diperoleh kepadatan 5×10^4 sel/sumuran dan diinkubasi sampai 50-60% konfluen. Setelah itu diinkubasi dengan senyawa uji dengan kadar 370 µg/ml; 185 µg/ml dan 92,5 µg/ml selama 24 jam. Medium diambil, dicuci dengan PBS. *Cover slip* yang memuat sel diangkat, diletakan di atas *object glass*

dan ditambahkan 10 µL 1X *Working Solution* etidium bromida- akridin orange kemudian sel segera diamati di bawah mikroskop flouresens (Zeiss MC 80). Sel hidup berfluoresensi hijau (dengan akridin oranye) dan sel mati berfluoresensi merah (dengan etidium bromida).

5. KLT (Kromatografi Lapis Tipis)

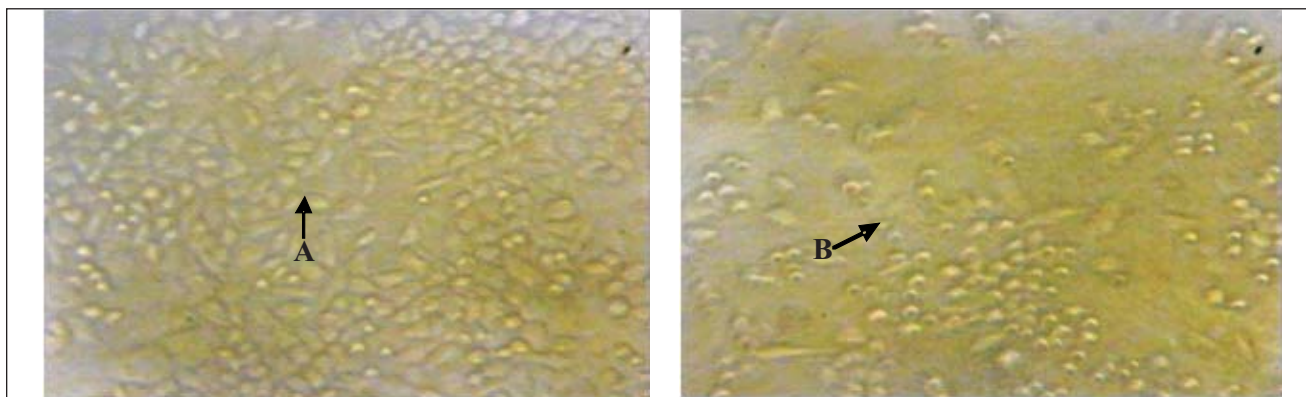
Chamber dijenuhkan dengan memasukkan fase gerak etil asetat : methanol : air dengan perbandingan 10 : 1,35 : 1, kemudian sampel dilarutkan dengan pelarut etanol 70% sebanyak 1 ml. Setelah jenuh sampel ditotolkan, pada fase diam silica gel GF₂₅₄ menggunakan pipa kapiler 1 µl, selanjutnya diamati dibawah UV 254 nm. Plate silika yang sudah ditotolkan dimasukkan ke dalam chamber yang telah dijenuhkan dan dielusi sampai batas elusi. Setelah elusi plate silika diambil dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan pada suhu ruangan. Setelah kering bercak diamati dibawah UV 254, kemudian difoto dan hitung Rf.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada percobaan ini, uji sitotoksisitas dilakukan dengan metode MTT. Metode MTT dipilih karena telah terbukti lebih sensitive, cepat dan akurat dibandingkan dengan metode perhitungan langsung (Doyle and Griffiths, 2000). Metode MTT juga memiliki kekurangan yaitu sampel yang berwarna dapat memberikan absorbansi sehingga absorbansi yang terbaca tidak hanya warna ungu yang sebanding dengan jumlah sel hidup tetapi juga warna dari sampel. Hal ini dapat diatasi dengan cara menggunakan control sampel untuk mengeliminasi pengaruh dari sampel yang berwarna sehingga hasil menjadi lebih valid.

Reagen MTT akan bereaksi dengan sel hidup dan akan pecah menjadi garam formazan oleh enzim *reduktase suksinat tetrazolium* yang termasuk dalam rantai respirasi mitokondria dan hanya aktif pada sel hidup. Reaksi antara MTT dengan enzim *reduktase suksinat tetrazolium* merupakan enzimatis yang berlangsung continue sehingga diperlukan reagen *stopper* (SDS 10% dalam HCl 0,0 1N) bertujuan untuk menghentikan reaksi enzimatis, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Intensitas warna ungu ditetapkan secara spektrofotometri dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 550 nm.

Uji sitotoksisitas fraksi petroleum eter ekstrak etanol *Elephantopus scaber* Linn. terhadap sel Hela dilakukan dengan metode MTT dengan seri kadar fraksi petroleum eter ekstrak etanol *Elephantopus scaber* Linn. yaitu 400; 200; 100; 50; 25 µg/ml. Dilakukan pula kontrol sel yang digunakan untuk



Gambar 1. Morfologi sel HeLa diamati dibawah mikroskop perbesaran 100x. (A) Morfologi sel HeLa pada kelompok kontrol setelah 24 jam (B) Morfologi sel HeLa pada perlakuan 400 µg/mL.

mengetahui besarnya absorbansi yang dihasilkan jika kehidupan sel 100 %. Aktivitas sitotoksik fraksi petroleum eter ekstrak etanol tapak liman terhadap sel HeLa dapat diamati dari perubahan morfologi sel setelah 24 jam perlakuan. Sel mengalami perubahan bentuk menjadi lebih bulat dengan kepadatan lebih rendah dibandingkan dengan kontrol sel (Gambar 1).

Berdasarkan gambar 1 tampak sel HeLa pada kelompok kontrol berbentuk poligonal dengan intisel yang tampak jelas. Kelompok ekstrak etanol tapak liman kadar 400 µg/mL mempengaruhi perubahan morfologi sel menjadi lebih bulat berukuran kecil dengan kepadatan sel yang lebih rendah dibandingkan dengan kontrol. Pada penelitian ini masing-masing subyek dilakukan replikasi 3 kali dan kemudian dilakukan penghitungan jumlah sel HeLa hidup tiap kelompok. Efek sitotoksik terhadap sel HeLa dilihat

ketoksikan yang tinggi terhadap sel Hela. Semakin besar kadar atau konsentrasi senyawa uji terhadap sel Hela maka semakin besar pula nilai probit. Selain itu semakin rendah fraksi petroleum eter ekstrak etanol (*Elephantopus scaber* L. pada perlakuan maka semakin banyak sel yang hidup dan presentase kematian semakin rendah.

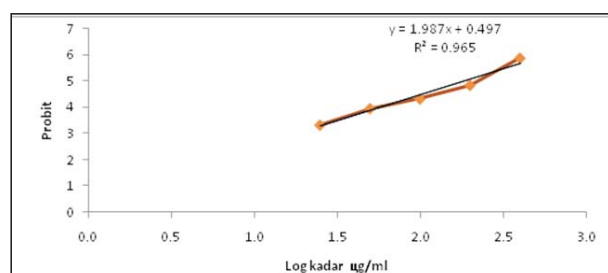
Dari grafik hubungan log kadar fraksi petroleum eter ekstrak etanol *Elephantopus scaber* Linn. dengan angka probit (Gambar 2) diperoleh nilai regresi linier $Y = 1,987x + 0,497$ dengan koefisien korelasi 0,971. Harga IC_{50} fraksi petroleum eter ekstrak etanol (*Elephantopus scaber* Linn. terhadap sel Hela diperoleh dengan memasukan harga probit (Y) 5 kedalam persamaan regresi linier sehingga diperoleh harga IC_{50} sebesar 184,59 µg/ml. Pada penelitian ini yang dilakukan hanya mengamati efek

Tabel I. Hasil perhitungan % kematian oleh perlakuan fraksi petroleum eter ekstrak etanol *Elephantopus scaber* Linn terhadap sel Hela

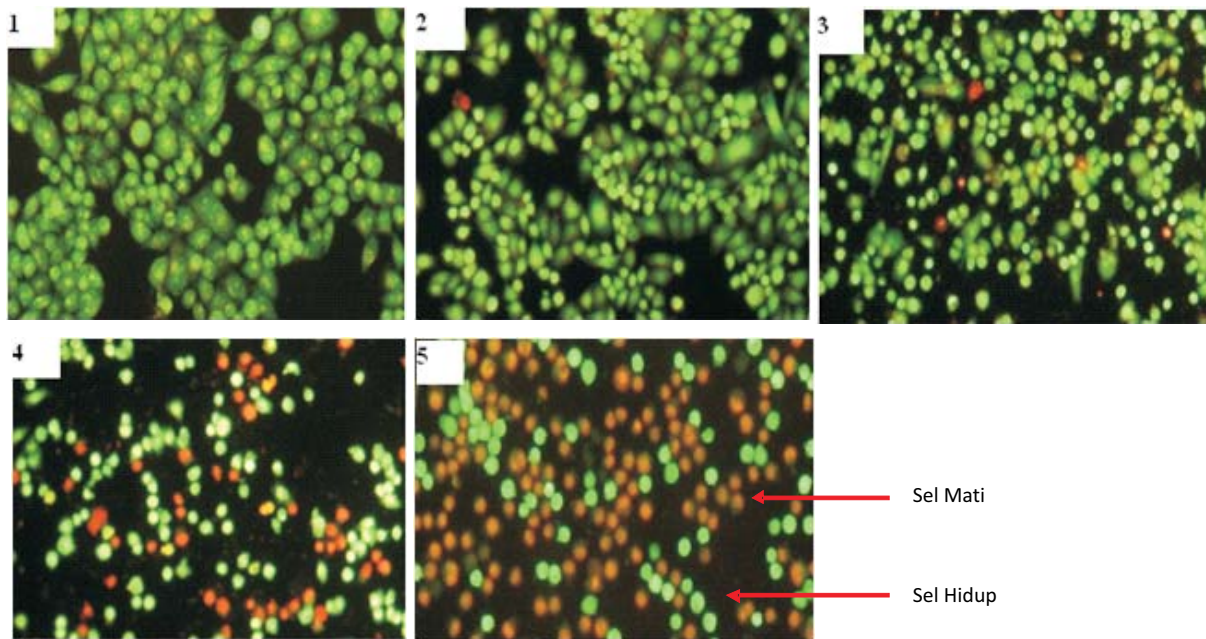
kadar µg/ml	Log kadar	Absorbansi	%kematian	Probit
400	2,602	0,256±0,01	79%	5,8834
200	2,301	0,696±0,05	44%	4,8490
100	2,000	0,929±0,02	25%	4,3255
50	1,699	1,049±0,10	15%	3,9636
25	1,398	1,171±0,01	5%	3,3351

dari prosentase sel HeLa yang hidup. Uji sitotoksis dilakukan dengan metode MTT. Pengukuran dilakukan menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 550 nm. Data yang didapat berupa data absorbansi. Absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menghitung presentase kematian sel yang kemudian dikonversikan menjadi harga probit sehingga diperoleh data yang tertera pada Tabel I.

Berdasarkan data yang disajikan pada Tabel I diketahui bahwa fraksi petroleum eter ekstrak etanol *Elephantopus scaber* Linn mempunyai potensi



Gambar 2. Grafik hubungan antara logaritma kadar (µg/ml) fraksi petroleum eter ekstrak etanol *Elephantopus scaber* Linn dengan angka probit pada sel Hela.



Gambar 3. Hasil Pengecatan sel HeLa dengan *acridine orange* dan *ethidium bromide* (AO-EB) perbesaran 100x. Keterangan: Kontrol sel (1), Kontrol DMSO (2), Kadar 92.5µg/ml (3), Kadar 185 µg/ml (4) dan Kadar 370 µg/ml (5).

sitotoksik pada sel HeLa sebagai model kanker serviks, tetapi selektivitas sitotoksik terhadap sel normal belum dilakukan sehingga tingkat keamanan fraksi petroleum eter ekstrak etanol daun tapak liman terhadap sel normal belum diketahui.

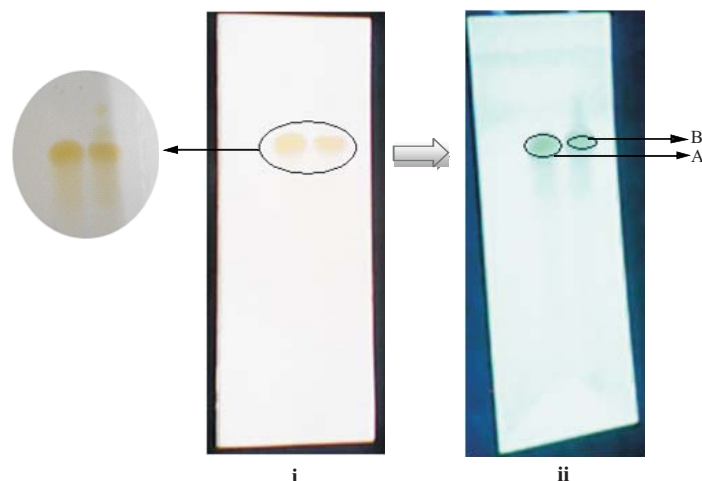
Pada uji apoptosis dalam menentukan kadar pengujian mengacu pada nilai IC_{50} yaitu 184,59µg/ml. Untuk memudahkan perhitungan dalam pembuatan kadar uji apoptosis nilai IC_{50} dibulatkan menjadi 185 µg/ml. Uji Apoptosis dilakukan dengan 3 kadar yaitu kadar 185 µg/ml, dua kali kadar dari IC_{50} dan setengah dari IC_{50} yaitu 370µg/ml dan 92,5 µg/ml. Hal ini bertujuan untuk menentukan apakah pada kedua kadar yang diujikan diluar nilai IC_{50} tersebut dapat memacu Apoptosis. Hasil uji apoptosis sel hidup akan berfluoresensi hijau dengan *acridine orange* dan sel mati

akan berfluoresensi merah karena berinteraksi dengan *ethidium bromide*.

Berdasarkan hasil pengamatan dengan metode akridin orange dan ethidium bromide (AO-EB) pada gambar 3 kontrol sel hanya terlihat fluoresensi hijau karena hanya menyerap *acridine orange*, *ethidium bromide* tidak dapat masuk pada kontrol sel karena integritas membran sel masih baik. Sedangkan pada kontrol DMSO terlihat fluoresensi hijau dengan sedikit fluoresensi merah hal ini menandakan bahwa pelarut DMSO tidak bersifat sitotoksik terhadap sel HeLa. Selain itu pada sel dengan perlakuan juga terlihat adanya fragmentasi inti sel yang kemudian menjadi badan-badan apoptosis. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan fraksi petroleum eter ekstrak etanol *Elephantopus scaber* Linn terhadap sel HeLa

Tabel II. Presentase kematian apoptosis

Kadar	Sel hidup	Sel Mati	% apoptosis	Rata-rata
92,5 µg/ml	368	17	4,42%	4,55± 0,03
	353	19	5,11%	
	302	13	4,13%	
185 µg/ml	291	197	40,37%	42,21± 0,01
	205	170	45,33%	
	140	97	40,93%	
370 µg/ml	206	377	64,67%	65,72 ± 0,01
	175	343	66,22%	
	198	389	66,27%	



Gambar 4.

Hasil KLT fraksi petroleum ether ekstrak atanol dengan fase diam silica gel GF₂₅₄, fase gerak etil asetat:methanol:air (10:1,35:1). A. standar quersetin dan B fraksi petroleum eter ekstrak etanol *Elephantopus scaber* Linn (i) deteksi sinar tampak(ii) deteksi UV

menyebabkan terjadinya apoptosis dengan presentase kematian sel dapat dilihat pada Tabel II.

Uji kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang dilakukan dalam penelitian ini hanya untuk mendukung adanya senyawa flavonoid pada fraksi petroleum eter ekstrak etanol daun tapak liman. Karena dari penelitian yang dilakukan oleh Xu *et al* (2006) dan Geetha *et al* (2011) senyawa aktif dari tapak liman yang berperan penting sebagai agen antitumor yaitu deoxyelephantopin. Fase gerak yang digunakan adalah etil asetat : methanol : air dengan perbandingan 10 : 1,35 : 1. Fase diam yang digunakan adalah silica gel GF 254.

Gambar 4 menunjukkan bahwa fraksi petroleum eter ekstrak etanol *Elephantopus scaber* Linn. mengandung flavonoid. Pada plate KLT fraksi petroleum eter ekstrak etanol daun tapak liman setelah dielusi ada tiga spot dengan nilai Rf 0,75; 0,8125 dan 0,9. Harga Rf standar flavonoid (Quersetin) adalah 0,75. Hal ini dapat disimpulkan bahwa fraksi petroleum eter ekstrak etanol daun tapak liman mengandung senyawa flavonoid.

Penelitian ini menunjukkan bahwa fraksi petroleum eter ekstrak etanol *Elephantopus scaber* Linn bersifat sitotoksik dan memacu kematian sel HeLa dengan apoptosis. kemampuan memacu apoptosis menjadi hal yang penting, karena diharapkan obat-obat kanker yang ditemukan baru dapat memacu apoptosis pada sel-sel kanker tanpa membahayakan sel-sel normal. Ho *et al* (2011) melaporkan bahwa ekstrak *Elephantopus scaber* Linn bersifat sitotoksik dan memacu apoptosis melalui induksi p53 pada sel kanker payudara MCF-7 dan bersifat nontoksik terhadap sel normal payudara (MCF10A). Dari penelitian ini juga dilaporkan bahwa *Elephantopus scaber* Linn mengandung falvonoid dan melengkapi komponen yang dilaporkan Xu *et al*

(2006) bahwa *Elephantopus scaber* Linn mengandung beberapa komponen seskuiterpen lakton.

KESIMPULAN

Fraksi petroleum eter ekstrak etanol daun tapak liman bersifat sitotoksik dan mampu menginduksi apoptosis terhadap sel HeLa.

DAFTAR PUSTAKA

- Apantaku, L.M., 2002, Breast Conseving Surgery for Breast Cancer, *Am,Fam, Physician* 66 (12) : 2271-2278.
- Canava, T. P., Doshi N. R., 2000, Cervical Cancer, *Physic*, 16:1369 – 1376. Doyle, A., and Griffiths, J.B., 2000, *Cell and Tissue Culture for MedicalResearch* (3) 11-31: Jhon Wiley & Sons.Ltd.NewYork.
- Fisher, D.E., 1994, *Apoptosis in Cancer Therapy* : Crossing the Treshold, *Cell*78:539-542.
- Geetha, B, S., Nair, Mangalam, S., Latha, P, G., Remani, P., 2011, Sesquiterpen Lactones Isolated from *Elephantopus scaber* L. Inhibits Human Lymphocyte proliferaion and the Growth of Tumor Cell Lines and Induces Apoptosis In Vitro. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*: Volume 2012, Article ID 721285, 8 pages doi:10.1155/2012/721285
- Gibbs, J.B., 2000, Mechanism Based Target Identification and Drug Discovery in Cancer Reasearch, *Science*, 287.
- Ho, W.Y., Yeap, S.K., Ho, C.L. Raha, A.R., Suraini, A.A., Alitheen, N.B., 2011, *Elephantopus scaber* induces cytotoxicity in MCF-7human breast cancer cells via p53-induced apoptosis,

Journal of medicinal Plant Research, 5(24), pp. 5741-5749.

Mutschler, E., 1991, *Dinamika Obat Buku Ajaran Farmakologi dan Toksikologi Edisi V*, Diterjemahkan oleh Mathilda B.Widianto dan Anna Setiadi Ranti, ITB, Bandung, Hal 701,709,710.

Parkin, D.M., 2001, Global Cancer Statistic in the Year 2000, *Lancet Oncol* 2 (9), hal: 533-543.

Wan, Yo, Ho., Ky, Huynh., Yeap, S, K., Rahim, R, A., Omar, A, R., Ho, C, L., Alitheen, N, B., 2009,

Traditional practice, bioactivities and commercialization potential of Elephantopus scaber Linn. *Med Plants, ResVol.* 3(13), 1212-1221.

Xu, G., Q. Liang., Gong, Z., Yu, W., He, S., Xi, L., 2006, Antitumor Activities of The Four Sesquiterpene Lactones From *Elephantopus scaber*L., *Exp Oncol*, Volume 28, issue 2, 106-107.

