



Uji Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Polar, Semipolar, dan Non-Polar Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata*) terhadap Sel Kanker Hati (HepG2)

*Cytotoxic Activity Study of Polar, Semipolar, and Non-Polar Extracts of Sambiloto Leaves (*Andrographis paniculata*) Against Hepatocellular Carcinoma (HepG2) Cell Line*

Andzar Fikranus Shofa¹*, Tunas Alam², Nuralih³

¹ Program Studi Farmasi, FIKES UIN Syarif Hidayatullah, Ciputat, Tangerang Selatan, Indonesia

² Program Studi Farmasi, STIKes Prima Indonesia, Bekasi, Indonesia

³ Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Serpong, Tangerang Selatan, Indonesia

*E-mail: andzar@uinjkt.ac.id

Kata kunci:

Kanker;
Andrographis paniculata;
Sitotoksik;
HepG2; IC50

Keywords:

Cancer;
Andrographis paniculata;
Cytotoxic;
HepG2; IC50

Received:

11-05-2021

Revised:

27-10-2021

Accepted:

22-12-2021

Jurnal
Kefarmasian
Indonesia,
2022;12(1):25-30

DOI:

<https://doi.org/10.2435/jki.v12i1.4875>

Abstrak

Kanker menjadi salah satu penyebab kematian utama di Dunia selain HIV, malaria, dan TBC. Angka kejadian kasus kanker hati tahun 2018 mencapai 841 ribu dimana terjadi 782 kasus kematian. Pengobatan modern seperti pembedahan, radiasi dan kemoterapi memiliki berbagai kelemahan, yaitu efek samping yang tinggi, kegagalan terapi, serta biaya yang mahal. Oleh karena itu, WHO merekomendasikan obat herbal sebagai terapi komplementer untuk berbagai penyakit, salah satunya kanker. Sambiloto merupakan salah satu tanaman herbal yang telah banyak dimanfaatkan oleh masyarakat Indonesia. Potensi khasiat sambiloto sebagai tanaman herbal prospektif telah banyak dibuktikan baik melalui penelitian secara *in vitro* maupun secara *in vivo*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik dan nilai IC50 ekstrak polar, semipolar, dan non-polar daun sambiloto terhadap sel HepG2. Setiap ekstrak diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel HepG2 dengan konsentrasi 500; 250; 125; 62,5; 31,25; dan 15,625 µg/mL menggunakan metode MTT. Hasil penelitian menunjukkan nilai IC50 masing-masing ekstrak polar, semipolar, dan non polar sebesar 82,585; 53.154; 614.349 µg/mL. Berdasarkan hasil tersebut ekstrak etil asetat dan etanol daun sambiloto memiliki aktivitas antikanker yang kuat terhadap sel HepG2.

Abstract

Cancer is one of the causes of 6 major deaths in the world besides HIV, malaria, and tuberculosis. The incidence of liver cancer cases in 2018 reached 841 thousand, where there were 782 deaths. Modern medicine such as surgery, radiation, and chemotherapy has various drawbacks, high side effects, therapeutics failure, and high costs. Therefore, WHO recommends herbal medicine as a complementary therapy for various diseases, one of which is cancer. Sambiloto is one of the herbal plants that has been widely used by the people of Indonesia. The potential efficacy of sambiloto as a prospective herbal plant has been widely proven both through *in vitro* and *in vivo* studies. This study aims to determine the cytotoxic activity and IC50 value of polar, semipolar, and non-polar fractions of sambiloto leaves on HepG2 cells. Each fraction was tested for its cytotoxic activity against HepG2 cells with a concentration of 500; 250; 125; 62.5; 31.25; and 15,625 µg/mL using the MTT method. The results showed that the IC50 value for the polar, semipolar, and non-polar fractions was 82.585; 53,154; 614,349 µg / mL. Based on these results, the ethyl acetate and ethanol fractions of sambiloto leaves had strong cytotoxic activity against HepG2 cells.

PENDAHULUAN

Kanker merupakan salah satu penyebab kematian utama di dunia selain HIV, malaria, dan TBC. Menurut Prager et. al., sebanyak 8,8 juta orang mengalami kritis setiap tahunnya.¹ Pada tahun 2018 terjadi peningkatan kasus, yaitu 18,1 juta dimana angka kematian mencapai 9,6 juta jiwa. Kanker paru menempati urutan pertama dengan angka kejadian mencapai 11,6%, diikuti kanker payudara 11,6%, kanker prostat 7,1%, kanker kolon 6,1%, kanker lambung 5,7% dan kanker hati mencapai 4,7%.²

Data prevalensi kanker hati tahun 2018 menunjukkan terjadi 841 ribu kasus dengan kematian mencapai 782 ribu. Rata-rata kasus dan kematian meningkat 2 sampai 3 kali pada laki-laki di sebagian besar belahan dunia. Angka kematian kanker hati lebih tinggi di negara berkembang dari pada negara maju. Faktor risiko utama kanker hati yaitu infeksi kronis virus hepatitis B (HBV), hepatitis C (HCV), kontaminasi aflatoxin, kecanduan alkohol, obesitas, diabetes tipe 2 dan merokok.² Selain itu, ketepatan penanganan deteksi kanker serta ketersediaan pengobatan menjadi faktor lain yang meningkatkan angka kematian kanker hati.³

Hasil riset kesehatan dasar tahun 2018 proporsi jenis tata laksana kanker pada penduduk semua umur terdiri dari 61,8% dengan operasi, 17,3% dengan radiasi, 24,9% dengan kemoterapi, dan 24,1% pengobatan lainnya.⁴ Pengobatan dengan cara modern (operasi, radiasi, dan kemoterapi) memiliki berbagai kelemahan, yaitu risiko efek samping yang besar, kegagalan terapi, serta biaya yang mahal. Oleh karena itu, organisasi kesehatan dunia (WHO) merekomendasikan penggunaan obat herbal dalam pengobatan penyakit kronis, degeneratif, sampai kanker sebagai terapi komplementer.⁵ Penggunaan obat herbal dalam pengobatan penyakit menurut kelompok masyarakat tertentu dinilai lebih aman dari penggunaan obat sintetis. Selain itu, dengan adanya slogan *Back to Nature* mendorong masyarakat dalam

menggunakan obat herbal. Keamanan penggunaan obat herbal dapat dicapai dengan memperhatikan kebenaran bahan, ketepatan dosis, ketepatan waktu penggunaan(6).

Sambiloto (*Andrographis paniculata*) merupakan salah satu tumbuhan yang telah banyak digunakan oleh masyarakat Indonesia.⁷ Sambiloto masuk ke dalam famili Acanthaceae dan dikenal sebagai "King of Bitters". Berdasarkan aktivitas farmakologinya sambiloto dapat digunakan sebagai imunomodulator, iskemia miokardium, faringitis, dan infeksi saluran pernafasan. Selain itu, sambiloto memiliki aktivitas antimikroba, antiinflamasi, antihiperlipidemia, antioksidan, antiarteriosklerosis, anti-HIV, hepatoprotektor, antikanker.⁸

Pengujian aktivitas antikanker tanaman sambiloto telah banyak dilakukan baik secara in vitro maupun in vivo. Kandungan pada tanaman sambiloto, yaitu andrografolida secara aktif menginduksi apoptosis sel T leukemia limfoblastik.⁹ Aktivitas antikanker juga ditunjukkan oleh andrographolide dengan menginduksi apoptosis sel kanker payudara T47D serta menghambat proliferasi dan migrasi sel.⁸ Selain itu, sambiloto juga memiliki aktivitas antikanker terhadap sel IMR-32 dan HT-299.¹⁰ Namun, sedikit penelitian aktivitas antikanker sambiloto terhadap kanker hati. Oleh karena itu, perlu dilakukan kajian eksperimental terkait aktivitas antikanker sambiloto terhadap kanker hati guna menunjang literasi pemanfaatan bahan alam sebagai alternatif pengobatan kanker.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *Multiskan*TM FC *Microplate Photometer* dan Inkubator CO₂ (Thermo Scientific), *Biosafety Cabinet* (BioBase), dan *cryopreservation tank* (FranceLab, BR 2200 M: 197 L) telah tersedia di Laboratorium Kultur Sel, Teknologi Farmasi dan Medika, Gedung Laboratoria Pengembangan Teknologi Industri Agro

dan Biomedika, BPPT, Serpong.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain daun sambiloto, pelarut etanol 70%, etil asetat, dan n-heksan diperoleh dari Rofa Laboratorium Centre. *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM), *fetal bovine serum* (FBS) dan *Dimethylsulfoxide* (DMSO) dibeli dari GIBCO® (Invitrogen, USA) dan Sigma-Aldrich (USA).

Pembuatan Ekstrak Polar, Semipolar dan Non-polar Daun Sambiloto

Daun sambiloto diambil dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro), Bogor, Jawa Barat. Sebanyak 5 kg daun sambiloto untuk masing-masing pelarut diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70%, etil asetat dan n-heksan dengan perbandingan 1:3. Hasil ekstraksi dilakukan pemekatan, sehingga diperoleh ekstrak kental dari masing-masing pelarut yang digunakan.

Kultur Sel HepG2

Kultur sel HepG2 dilakukan dengan beberapa tahapan, yaitu pencairan stok beku (*thawing*), subkultur, dan pembuatan stok beku (*frozen stock*). Pencairan stok beku dilakukan menggunakan medium DMEM dengan FBS 10%. Kultur sel dilakukan pada suhu 37°C dengan CO₂ 5%. Kultur sel tersebut dilakukan subkultur jika sel sudah membentuk lapisan monolayer pada dasar wadah. Subkultur dilakukan dengan mengganti medium DMEM lama dengan medium DMEM baru. Proses selanjutnya pembuatan stok beku dilakukan dengan memindahkan kultur sel ke dalam tabung kriopreservasi 1,8 mL. Tabung berisi kultur sel dimasukkan ke dalam freezer -80°C selama semalam, kemudian dipindahkan kembali ke dalam cryotank berisi nitrogen cair (-196°C).¹¹

Uji Sitotoksik dengan Metode *Methylthiazol Tetrazolium* (MTT)

Pengujian sitotoksik masing-masing ekstrak daun sambiloto dilakukan dengan metode MTT. Doksirubisin digunakan

sebagai senyawa kontrol positif. Sel HepG2 dikultur dalam DMEM lengkap dengan konsentrasi FBS 10%. Selanjutnya, dibuat larutan stok masing-masing ekstrak dengan konsentrasi 2000 µg/mL. Kemudian, setiap ekstrak dibuat seri konsentrasi larutan 500; 250; 125; 62.5; 31.25; and 15,625 µg/mL. Sementara untuk doksorubisin dibuat konsentrasi larutan 10; 8; 6; 4; 2; 1 µg/mL. Data yang diperoleh adalah data absorbansi dari masing-masing ekstrak yang diuji sitotoksik.¹²

Analisis Data

Perhitungan nilai IC₅₀ menggunakan analisis regresi linier berdasarkan nilai absorbansi yang diperoleh. Perhitungan IC₅₀ dilakukan untuk mengetahui konsentrasi ekstrak etanol, etil asetat, dan n-heksan daun sambiloto yang dapat menghambat proliferasi sel kanker hati sebanyak 50%. Data IC₅₀ masing-masing ekstrak dibahas secara deskriptif serta disajikan dalam bentuk tabel dan gambar.¹¹

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji sitotoksik merupakan metode *in vitro* yang umum digunakan untuk memprediksi toksisitas suatu zat terhadap berbagai jaringan atau sel (termasuk sel kanker) berdasarkan nilai IC₁₀ dan IC₅₀. Pemilihan metode uji didasarkan pada tujuan serta pemilihan parameter spesifik dalam mendeteksi senyawa toksikan potensial. Beberapa parameter yang digunakan antara lain viabilitas sel, proliferasi sel, kerusakan membran plasma, serta aktivitas metabolisme. Pengukuran efek intraseluler yang merugikan dalam aktivitas metabolik sel dapat menggunakan metode *Methylthiazol Tetrazolium* (MTT).¹¹

Metode MTT sangat sesuai digunakan untuk menganalisis proliferasi, viabilitas sel dan aktivitas sitotoksik zat. Pengujian sitotoksik dengan metode MTT memiliki prinsip reduksi garam tetrazolium dengan enzim reduktase mitokondria membentuk kristal formazan berwarna ungu, tidak larut

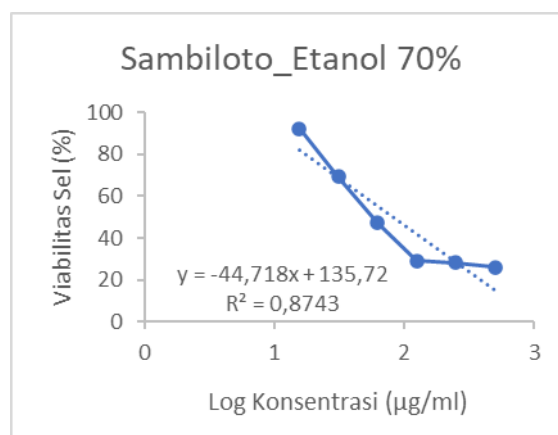
dalam air serta mengendap di dalam sel. Kemampuan sel untuk mengubah MTT menjadi formazan akan hilang seiring dengan kematian sel.¹¹

Hasil perhitungan % viabilitas sel HepG2 terhadap ekstrak daun sambiloto dengan berbagai macam konsentrasi dapat dilihat pada Tabel 1. Data viabilitas sel HepG2 dari ketiga ekstrak tersebut, yaitu etanol 70%, etil asetat, dan n-heksan menunjukkan terjadi penurunan % viabilitas sel HepG2 dengan bertambahnya konsentrasi sampel. Selanjutnya, data log konsentrasi dan % viabilitas sel HepG2 dimasukkan ke dalam persamaan regresi linear untuk menentukan pengaruh konsentrasi sampel terhadap viabilitas sel serta nilai IC₅₀ dari masing-masing ekstrak.

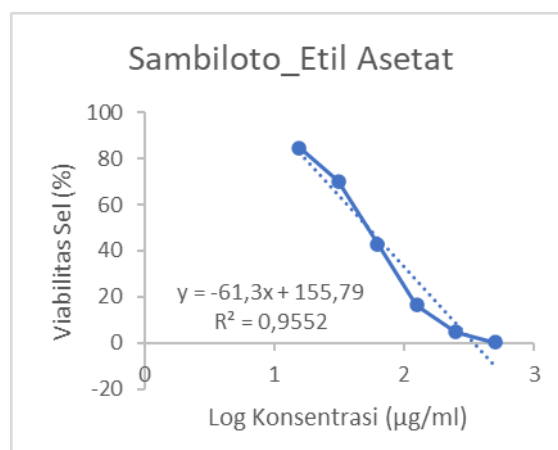
Tabel 1. Persentase (%) viabilitas sel HepG2 terhadap Ekstrak daun sambiloto dengan berbagai konsentrasi

| Nama Sampel | Viabilitas Sel HepG2 (%) / Konsentrasi (µg/ml) | | | | | |
|---------------------|--|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 15,625 | 31,25 | 62,5 | 125 | 250 | 500 |
| Ekstrak Etanol 70% | 92,203 | 69,203 | 47,200 | 29,020 | 28,297 | 26,152 |
| Ekstrak Etil Asetat | 84,775 | 70,097 | 42,814 | 16,382 | 4,659 | 0,152 |
| Ekstrak n-Heksan | 99,361 | 97,107 | 94,214 | 90,073 | 68,331 | 45,767 |

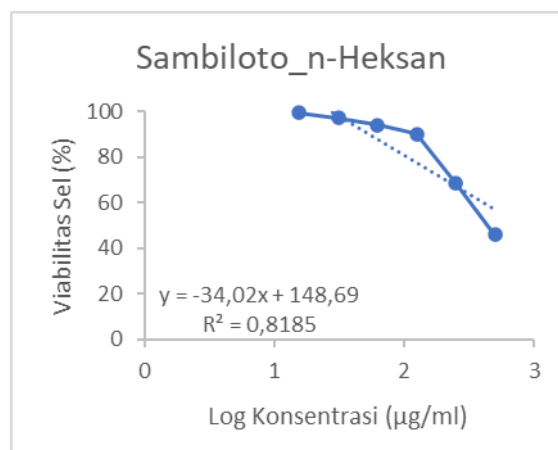
Hasil perhitungan regresi linear dapat dilihat pada Gambar 1, Gambar 2, dan Gambar 3. Besarnya pengaruh konsentrasi sampel terhadap viabilitas sel dapat dilihat berdasarkan nilai koefisien determinasi (R²). Nilai koefisien determinasi pada masing-masing ekstrak > 0.8 yang menunjukkan bahwa variabel konsentrasi memengaruhi % viabilitas sel > 80% dan sisanya dipengaruhi oleh variabel lain yang tidak diteliti.



Gambar 1. Grafik hubungan antara log konsentrasi ekstrak etanol 70% daun sambiloto dengan % viabilitas sel HepG2



Gambar 2. Grafik hubungan antara log konsentrasi Ekstrak etil asetat daun sambiloto dengan % viabilitas sel HepG2



Gambar 3. Grafik hubungan antara log konsentrasi Ekstrak n-heksan daun sambiloto dengan % viabilitas sel HepG2

Hasil perhitungan nilai IC₅₀ untuk masing-masing ekstrak daun sambiloto terhadap sel HepG2 dapat dilihat pada Tabel 2. Berdasarkan hasil uji MTT untuk ekstrak etanol 70%, etil asetat, dan n-heksan memiliki nilai IC₅₀ berturut-turut 82,585; 53,154; 614,349 µg/mL. Menurut klasifikasi aktivitas sitotoksik suatu senyawa memiliki aktivitas sitotoksik sangat kuat jika nilai IC₅₀ <10 µg/mL, aktivitas kuat jika nilai IC₅₀ berkisar 10 – 100 µg/mL, dan aktivitas sedang jika nilai IC₅₀ berkisar 100 – 500 µg/mL.¹³

Beberapa penelitian lain melaporkan aktivitas antikanker dari sambiloto. Senyawa andrografolid dalam sambiloto telah diidentifikasi sebagai senyawa potensial dan bertanggung jawab terhadap aktivitas antikanker.¹⁴ Andrografolid menyebabkan efek antikanker terhadap sel b limfoma,¹⁵ sel leukemia K562,¹⁶ dan sel kanker payudara MDA-MB 231 dan MCF-10A.¹⁷ Andrografolid menyebabkan efek apoptosis pada sel-sel kanker tersebut, sehingga terjadi kematian sel.¹⁸

Oleh karena itu, berdasarkan hasil penelitian ini ekstrak etanol dan etil asetat daun sambiloto memiliki aktivitas sitotoksik kuat terhadap sel HepG2, sedangkan ekstrak n-heksan tidak memiliki aktivitas sitotoksik, sehingga ini dapat menjadi salah satu sumber acuan dalam mengembangkan obat antikanker yang berasal dari bahan alam.

Tabel 2. Nilai IC₅₀ Ekstrak etanol, etil asetat, n-heksan daun sambiloto, dan doksorubisin terhadap sel kanker hati (HepG2)

| Nama Sampel | IC ₅₀ (µg/ml) |
|---------------------|--------------------------|
| Ekstrak Etanol 70% | 82.585 |
| Ekstrak Etil Asetat | 53.154 |
| Ekstrak n-Heksan | 614.349 |
| Doksorubisin | 0.765 |

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak etil asetat dan etanol daun sambiloto memiliki aktivitas sitotoksik yang kuat terhadap sel HepG2

dengan nilai IC₅₀ berturut-turut 53,154 µg/mL dan 82,585 µg/mL, sedangkan ekstrak n-heksan tidak memiliki efek sitotoksik terhadap sel HepG2.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kemenristek/BRIN atas pendanaan yang telah diberikan serta kepada Tim Laboratorium Kultur Sel, Teknologi Farmasi dan Medika, Gedung Laboratoria Pengembangan Teknologi Industri Agro dan Biomedika, BPPT yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR RUJUKAN

1. Prager GW, Braga S, Bystricky B, Qvortrup C, Criscitiello C, Esin E, et al. Global cancer control: Responding to the growing burden, rising costs and inequalities in access. *ESMO Open*. 1 Februari 2018;3(2):e000285.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal of Clinicians*. 2018;68(6):394–424. <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21492>
3. Dewi M. Sebaran Kanker di Indonesia, Riset Kesehatan Dasar 2007. *Indonesian Journal of Cancer*. 2017;11(1):1–8.
4. Kemenkes RI. Laporan Nasional_RKD2018_FINAL.pdf [Internet]. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. 2018. hal. 198.
5. WHO. WHO global report on traditional and complementary medicine. 2019
6. Sari LORK. Pemanfaatan Obat Tradisional Dengan Pertimbangan Manfaat Dan Keamanannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 2006;III(1):1–7.
7. Shofa AF, Purba AV, Setyahadi S. Interaksi ekstrak sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.F.)Ness) dengan glibenklamid terhadap ekspresi gen CYP3A4 pada kultur sel HepG2. *Jurnal Sains Farmasi dan Klinis*. 2017;4(1):73–8.
8. Dai Y, Chen SR, Chai L, Zhao J, Wang Y, Wang Y. Overview of pharmacological activities of *andrographis paniculata* and its major compound andrographolide.

- Critical Review in Food Science and Nutrition. 2019;59(0):S17–29. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2018.1501657>
9. Yang T, Yao S, Zhang X, Guo Y. Andrographolide inhibits growth of human T-cell acute lymphoblastic leukemia Jurkat cells by downregulation of PI3K/AKT and upregulation of p38 MAPK pathways. *Drug Design Development and Therapy*. 2016;10:1389–97.
 10. Shanmugam R, Nagalingam M, Ponnaiyandurai M, Vanaja M. Anticancer Activity of Andrographis paniculata Leaves Extract Against Neuroblastoma (IMR-32) and Human Colon (HT-29) Cancer Cell Line. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2015;6(January):183.
 11. Vinken M, Rogiers V, editor. *Protocols in vitro hepatocyte research: Series V.1250*. New York: Heidelberg Springer; 2015
 12. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2018;2018(6):469–71.
 13. Weerapreeyakul N, Nonpunya A, Barusux S, Thitimetharoch T, Sripanidkulchai B. Evaluation of the anticancer potential of six herbs against a hepatoma cell line. *Chinese Med (United Kingdom)*. 2012;7:1–7.
 14. Tan WSD, Liao W, Zhou S, Wong WSF. Is there a future for andrographolide to be an anti-inflammatory drug? Deciphering its major mechanisms of action, *Biochem. Pharmacol*. 2017; 139: 71–81.
 15. Ding L, Li J, Song B, Xiao X, Huang W, Zhang B, Tang X, et al. Andrographolide prevents high-fat diet-induced obesity in C57BL/6 mice by suppressing the sterol regulatory element binding protein pathway, *J. Pharmacol. Exp. Therapeut*. 2014; 351: 474–83.
 16. Yang EJ, Song KS. Andrographolide, a major component of *Andrographis paniculata* leaves, has the neuroprotective effects on glutamate-induced HT22 cell death, *J. Funct. Foods*. 2014; 9: 162–72.
 17. Zhang Z, Lai D, Wang L, Yu P, Zhu L, Guo B, et al. Neuroprotective effects of the andrographolide analogue AL-1 in the MPP(p)/MPTP-induced Parkinson's disease model in vitro and in mice, *Pharmacol. Biochem. Behav*. 2014; 122: 191–202.
 18. Islam MT, Ali ES, Uddin SJ, Islam MA, Shaw S, Khan IN, et al. Andrographolide, a diterpene lactone from *Andrographis paniculata* and its therapeutic promises in cancer. *Cancer letters*. 2018; 420: 129–45.