

Sitotoksitas Fraksi *Piper porphyrophyllum* terhadap Sel Kanker T47D

Cytotoxic Activity of *Piper porphyrophyllum* Fraction against T47D Cancer Cell

Yus Hargono Cahyaning Yudi¹⁾, Hartanto Nugroho²⁾

¹⁾Universitas Al-Ghifari Bandung, email: yuscahyaningyudi@gmail.com

²⁾Universitas Gadjah Mada, email: hartantonugroho@yahoo.com

ABSTRACT

Genus *Piper* has been using traditionally as medicines. *Piper aborescen*, *P. crocatum*, *P. Imperiale*, *P. longum*, and *P. methysticum* have ability to inhibit breast cancer proliferation. This research goal is to know cytotoxic activity of *Piper porphyrophyllum* fraction against T47D cancer cell. Extraction it's leaves use soxhlet with chloroform as solvent then use vacuum liquid chromatography. Cytotoxic activity of *Piper porphyrophyllum* fraction determined by MTT assay. The result showed that fraction group A has lowest IC₅₀ (36.22 µg/ml).

Key word: *Piper*, Cytotoxicity, MTT Assay

Pendahuluan

Tumbuhan Genus *Piper* memiliki khasiat obat. Masyarakat Indonesia menggunakan tumbuhan Genus *Piper* sebagai obat tradisional (Asmarayani & Purnomo, 2004). Kajian penelitian lebih lanjut menemukan bahwa metabolit sekunder *P. methysticum* dapat memberikan efek narkotik dan bersifat sedatif (Agusta, 1998). Buah *P. longum* dapat digunakan untuk mengobati kejang usus (Perry & Metzger, 1980). *P. aduncum* secara tradisional dimanfaatkan sebagai obat sakit perut, kencing nanah, penolak serangga dan memiliki aktivitas sebagai antibakteri terhadap *Bacillus subtilis*, *Micricoccus luteus* dan *Escherichia coli* (Orjala *et al.*, 1993). Ekstrak kloroform *P. aborescen* mengandung terpenoid dan coumarin yang mampu menghambat aktivitas sel kanker payudara (Geran dalam Parmar *et al.*, 1997). Tsai *et al.* (2005) menyatakan piplartine (kelompok alkaloid) dari ekstrak *P. aborescens* memiliki IC₅₀ 21,5 µg/ml terhadap sel kanker prostat (P-388).

Pengobatan yang sangat diperlukan hingga akhir tahun 2011 adalah pengobatan terhadap pasien kanker payudara. Varmus (2011) menyatakan 12% kematian penduduk dunia disebabkan oleh kanker. Secara genetis, kanker payudara ini muncul akibat terjadinya *germ line mutation*. Mutasi terjadi pada gen *BRCA1*, *BRCA2*, gen *ATM*, *CHEK2*, *PTEN*, dan *TP53* (Miki *et al.*, 1994). Pada tingkat protein terjadi mutasi pada protein p53 (*missence mutation* pada residu 194) sehingga p53 tidak dapat berikatan dengan elemen respon pada DNA.

Menurut Sarker *et al.* (2006) jika ada satu spesies dalam genus diketahui memiliki metabolit sekunder spesifik untuk penyakit tertentu maka spesies lain dalam satu genus diduga memiliki metabolit sekunder yang mirip atau memiliki aktivitas spesifik yang sama. Oleh karena itu, dilakukan penelitian untuk mengetahui aktivitas sitotoksik fraksi gabungan *Piper porphyrophyllum* terhadap sel kanker T47D.

Metode Penelitian

Sampel berupa 20 gram daun ke-4 sampai ke-6 dari *Piper porphyrophyllum* dibersihkan dari kotoran, dikeringanginkan dan dihaluskan (dijadikan serbuk). Kemudian diambil sebanyak 10 g serbuk untuk dilakukan sokletasi dengan pelarut kloroform sebanyak 150 ml.

Ekstrak *Piper porphyrophyllum* difraksinasi dengan metode kromatografi cair hampa (*Vacuum Liquid Chromatography*) dengan fase diam serbuk silika gel 60 PF₂₅₄. Dibuat kolom dengan lapisan terbawah diberi kertas saring, kemudian silika gel sebanyak 10 gr dimasukkan dan diratakan. Pada lapisan teratas diberi campuran silika gel 4 gram dan ekstrak 2 gram. Lalu ditutup dengan potongan kertas saring. Pemilihan fase gerak berdasarkan gradien kepolaran yang semakin bertambah yang disesuaikan dengan sifat kepolaran ekstrak. Komposisi dan jenis pelarut yang digunakan dalam fraksinasi tertera pada Tabel 1 sebagai berikut.

Tabel 1. Komposisi dan jenis pelarut yang digunakan dalam fraksinasi

No.	Pelarut	Volume (ml)
1	Heksan 100%	100
2	Kloroform 100%	100
3	Kloroform : ethyl acetate = 3 : 1	100
4	Kloroform : ethyl acetate = 1 : 1	100
5	Ethyl acetate 100%	100
6	Ethyl acetate : Methanol = 1 : 1	100
7	Methanol 100%	100
8	Kloroform : Methanol = 1 : 1	100

Monitoring senyawa dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Fase diam berupa silika gel 60 F₂₅₄ dengan fase gerak ditentukan berdasarkan uji pendahuluan yaitu Heksan : Aseton = 2 : 1. Profil

kromatogram divisualisasi dengan menggunakan sinar tampak, sinar UV dengan $\lambda = 254$ nm dan 366 nm.

Uji MTT assay dilakukan berdasar Moeljopawiro *et al.* (2007) dengan 10 mg fraksi dimasukkan dalam tabung eppendorf dan ditambah media kultur sedikit demi sedikit sampai 100 μ l sambil divortex agar homogen sehingga didapatkan larutan stok sampel dengan konsentrasi 1×10^5 μ g/ml. Kemudian dibuat seri dosis perlakuan 25, 50, 100, 200, dan 400 μ g/ml. Perlakuan ini masing-masing dibuat dalam 3 ulangan dalam 96 microwell plate.

Setelah 24 jam media kultur dibuang, dicuci dengan PBS (*Phosphate Buffered Saline*), ditambah larutan MTT (1 ml MTT dalam PBS ditambah media kultur sampai 10 ml, konsentrasi akhir 0,5 mg/ml) ke dalam setiap sumuran, dan diinkubasi lagi ke dalam inkubator selama 4 jam. Selanjutnya kultur sel ditambah masing-masing 100 μ l stopper SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) 10% dalam HCl 0,1 N (untuk melarutkan kristal purple formazan) dan dishaker selama 5 menit. Kemudian dibiarkan pada suhu kamar selama 1 malam. Absorbansi dibaca dengan microplate ELISA reader pada λ 595 nm. Hasil absorbansi dianalisis untuk menghitung % viabilitas sel dengan rumus (Moeljopawiro *et al.*, 2007) sebagai berikut :

$$\% \text{ viabilitas sel} = \frac{As - Am}{AK - Am} \times 100$$

As = absorbansi sampel

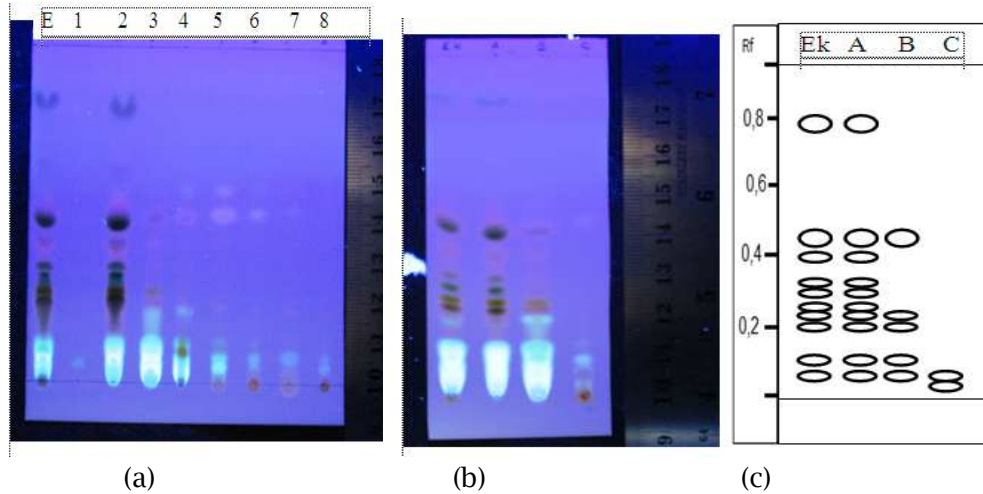
AK = absorbansi kontrol sel

Am = absorbansi kontrol media

Hasil dan Pembahasan

Monitoring senyawa hasil fraksinasi dengan KLT lalu digabung menjadi tiga fraksi yaitu fraksi A

berasal dari 1, 2, fraksi B dari 3, 4, 5 dan fraksi C dari 6, 7 dan 8 (tertera pada Gambar 1).



Gambar 1. Kromatogram Fraksi Gabungan dengan Fase Gerak Heksan : Aseton= 2:1 pada UV λ 366 nm. (a) KLT 8 fraksi (b) KLT fraksi gabungan (c) Profil Fraksi gabungan. E= ekstrak, A = fraksi A, B = fraksi B, C = fraksi C.

Tujuan penggabungan fraksi untuk mendapatkan sejumlah fraksi dengan kandungan senyawa toksik yang hampir sama sehingga memudahkan skrining melalui uji sitotoksitas karena lebih efisien. Bercak fraksi gabungan A dari *P. porphyrophyllum* pada hasil KLT memiliki ciri khas yaitu memiliki bercak berpendar pada Rf 0,09 dan 0,05; bercak sangat non polar pada Rf 0,82 serta memiliki bercak dengan warna hijau tua sampai hijau muda pada Rf 0,40; 0,35; 0,32 dan 0,26. Fraksi gabungan A memiliki minimal 10 senyawa berbeda (bervariasi warna dan sifat berpendarnya) sehingga fraksi gabungan A merupakan senyawa kompleks. Senyawa-senyawa tersebut dapat bersifat sinergis maupun antagonis terhadap sitotoksitasnya. Sarker *et al.* (2006) menyatakan sitotoksitas ekstrak terhadap sel kanker dapat meningkat apabila senyawa-senyawa poten dipisahkan dari senyawa lain yang bersifat antagonis. Hasil uji sitotoksitas fraksi gabungan A, B dan

C berupa IC_{50} tertera pada Tabel 2 sebagai berikut.

Tabel 2. Nilai IC_{50} Fraksi Gabungan Dibandingkan Doxorubicin Dan Vero

Senyawa	Nilai IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Fraksi A	36,22
Fraksi B	55,97
Fraksi C	942,06
Doxorubicin	32,04
Sel Vero	297,37

Nilai IC_{50} fraksi gabungan A dari *P. porphyrophyllum* paling rendah (36,22 $\mu\text{g/ml}$) dibanding 2 fraksi gabungan lainnya. Hal ini menunjukkan fraksi gabungan A dari *P. porphyrophyllum* merupakan fraksi potensial sebagai antikanker. Rasio ekstrak dibanding fraksi gabungan A dari *P. porphyrophyllum* adalah 1 : 0,41. Sitotoksitas fraksi gabungan A lebih kuat dibanding *Piper crocatum* (IC_{50} 44,25 $\mu\text{g/ml}$) (Wicaksono *et al.*, 2009) dan lebih kuat dibanding ekstrak kasar *P. porphyrophyllum* (IC_{50} 522,1 $\mu\text{g/ml}$). Perbandingan sitotoksitas fraksi gabungan A dari *P. porphyrophyllum* (36,22 $\mu\text{g/ml}$)

berbeda sedikit dengan sitotoksitas obat standar doxorubicin (32,04 µg/ml).

Hasil reaksi semprot menunjukkan fraksi A termasuk golongan senyawa terpenoid dan alkaloid. Hal ini karena fraksi A menunjukkan hasil positif ketika disemprot dengan serum (IV) sulfat, vanillin sulfat dan dragendrof. Jadi fraksi A merupakan kelompok senyawa sitotoksik potensial terhadap sel kanker payudara (T47D) yang memiliki kandungan senyawa terpenoid dan alkaloid.

Sitotoksitas dikaitkan keberadaan senyawa berpendar (Gambar 1) pada fraksi gabungan A, B dan C dari *P. porphyrophyllum* menunjukkan hubungan yang erat. Kromatogram yang menunjukkan senyawa berpendar dimiliki oleh fraksi gabungan A dan B memiliki sitotoksitas cukup baik yaitu berurutan 36,22 µg/ml dan 55,97 µg/ml sedangkan fraksi gabungan C tanpa senyawa berpendar memiliki sitotoksitas yang jauh berbeda yaitu 942,06 µg/ml. Hasil ini sesuai penelitian Geran dalam Parmar *et al.* (1997); Tsai *et al.* (2005); Bezerra *et al.* (2005); Jaspars & Tabudravu (2005); Reshmi *et al.* (2010); dan Raj *et al.* (2011) yang menemukan senyawa sitotoksik sebagai senyawa bercincin aromatis dan atau memiliki ikatan rangkap terkonjugasi yang panjang sehingga berflouresensi pada sinar UV dengan λ 366 nm.

Kesimpulan

Fraksi A *Piper porphyrophyllum* merupakan kelompok senyawa sitotoksik potensial terhadap sel kanker payudara (T47D) dengan IC₅₀ 36,22 µg/ml yang memiliki kandungan

senyawa terpenoid dan alkaloid.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Koordinator dan PIC Sub-aktivitas 2.1.4-III Program I-MHERE Fakultas Biologi-UGM yang telah memberikan dana dan dukungan kepada penulis.

Daftar Pustaka

- Agusta, A. 1998. *Minyak Atsiri Tumbuhan Tropika Indonesia*, Penerbit ITB, Bandung. Hal, 34-47.
- Asmarayani, R. & Purnomo. 2004. Hubungan Kekerabatan Antar Spesies *Piper* Berdasarkan Sifat Morfologi dan Minyak Atsiri Daun di Yogyakarta. *Biodiversitas*. 6 (1): 12-16.
- Bezerra, D.P., Pessoa, C., de Moraes, M.O., Silveira, E.R., Lima, M.A., Elmiro, F.J. & Costa-Lotuf, L.V. 2005. Antiproliferative Effects of Two Amides, Piperine and Piplartine from *Piper* Spesies. *J. Z. Naturforsch.* 60c: 539-543.
- Jaspars, M., & Tabudravu, J. N. 2005. Anticancer Activities of Constituents of Kava (*Piper methysticum*). *The South Pacific Journal of Natural Science*. 23: 26-29.
- Miki, Y., Swensen, J., Eidens, D.S., Futreal, P.A. & Skolnick, H.M. 1994. A Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene BRCA1. *Journal Science New Series*. 7: 266-278.
- Moeljopawiro, S., Nuringtyas, T.R., Noveriza, R., & Trisilawati, O. 2007. *Kajian Bioaktif Anti Kanker 3 Varietas Buah merah: Identifikasi Fraksi Bioaktif Anti Kanker*

- Payudara dan Kanker Rahim dan Mikrobia Kontaminan pada 3 Varietas Buah Merah (Pandanus conoideus Lamk.)*, Laporan Hasil Penelitian Kerjasama UGM dengan Sekretariat Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Yogyakarta. Hal 23-35.
- Orjala, J., Erdelmeier, C.A.J., Wright, A.D., Rali, T. & Sticher, O. 1993. Five New Prenylated-Hydroxybenzoic Acid Derivatives with Antimicrobial and Moluscicidal Activity from *Piper aduncum* Leaves. *Planta Med.* 59: 546-551.
- Parmar, V., Jain, S.C., Bisht, K.S., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O.D., Prasad, A.K., Wengel, J., Olsen, C.E. & Boll, P.M. 1997. Phytochemistry of the Genus *Piper*. *Phytochemistry.* 46 (4): 597-673.
- Perry, L. M. & Metzger, J. 1980. *Medicinal Plants of East and South East Asia. Attributed Properties and Uses*, The MIT Press, London.
- Raj, L., Ide, T., Gurkar, A.U., Foley, M., Schenone, M., Li, X., Tolliday, N.J., Golub, T.R., Carr, S.A., Shamji, A.F., Stern, A.M., Mandinova, A., Schreiber, S.L. & Lee, S.W. 2011. Selective Killing of Cancer Cell by a Small Molecule Targeting the Stress Response to ROS. *J. Nature.* 475: 231-234.
- Reshmi, S.K., Satya, E & Devi, P.S. 2010. Isolation of Piperidine from *Piper nigrum* and Its Antiproliferative Activity. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 4 (8): 562-573.
- Sarker, S.D., Latif, Z. & Gray, A.I. 2006. *Natural Product Isolation 2nd Edition*, Hamana Press, New Jersey. Hal 55-79.
- Tsai, I.L., Lee, F.P., Wu, C.C., Duh, C.Y., Ishikawa, T., Chen, J.J., Chen, Y.C., Seki, H. & Chen, I.S. 2005. New Cytotoxic Cyclobutanoid Amides, a New Furanid Lignan and Anti-Platelet Aggregation Constituents from *Piper aborescens*. *Planta Med.* 71 (6): 535-542.
- Varmus, H. 2012. *Natural Product for Cosmetic and Medicine*. Presentasi ilmiah disampaikan di UGM, Yogyakarta. Hal 7-14.
- Wicaksono, B.D., Handoko, Y.A., Arung, E.T., Kusuma, I.W., Yulia, D., Pancaputra, A.N. & Sandra, F. 2009. Antiproliferative Effect of the Methanol Extract of *Piper crocatum* Ruiz & Pav Leaves on Human Breast (T47D) Cells in Vitro. *Trp. J. Pharm. Res.* 8 (4): 345-352.