

Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol, Fraksi Etanol, Etil-Asetat, dan Heksana Kulit Jeruk Purut (*Citrus hystrix* DC.) terhadap Sel Kanker Payudara T47D

Cytotoxic Activity of Ethanolic Extract, Ethanolic, Acetic Acid and Hexane Fraction of Kaffir lime peels (*Citrus hystrix* DC.) against Breast Cancer Cells T47D

Isya Isma Nabilla, Peni Indrayudha*

Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Jl. A. Yani Tromol Pos 1 Pabelan, Kartasura, Sukoharjo, 57162, Indonesia

*E-mail: peni.indrayudha@ums.ac.id

Abstrak

Kulit jeruk purut (*Citrus hystrix* DC.) telah terbukti aktif terhadap sel HeLa. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan aktivitas sitotoksik ekstrak etanol, fraksi etanol, etil asetat, dan heksana kulit jeruk purut (*Citrus hystrix* DC.) pada sel kanker payudara T47D dan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa yang terdapat dalam kulit jeruk purut (*Citrus hystrix* DC.). Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan etanol 96%. Hasil ekstrak kentalnya difraksinasi dengan metode partisi menggunakan pelarut heksana, etil asetat, dan etanol. Uji aktivitas sitotoksik dilakukan dengan metode MTT. Identifikasi senyawa dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan fase diam silika GF 254. Fase gerak yang digunakan adalah heksana:etilasetat (6:4) untuk ekstrak etanol, fraksi etil asetat, dan heksana, serta heksana:etilasetat (4:6) untuk fraksi etanol. Hasil IC₅₀ ekstrak etanol, fraksi etil asetat, dan heksana yang diperoleh berturut-turut sebesar 268,49, 286,82, dan 136,27 μ g/mL. Ekstrak etanol, fraksi etil asetat, dan heksana mengandung senyawa golongan alkaloid, flavonoid, terpenoid, dan fenolik, sedangkan fraksi etanol hanya mengandung senyawa golongan flavonoid. Hasil uji sitotoksik menunjukkan ekstrak etanol, fraksi etanol, etil asetat, dan n-heksana kulit jeruk purut tidak aktif terhadap sel kanker payudara T47D.

Kata Kunci: *Citrus hystrix* DC., fraksinasi, T47D, IC₅₀

Abstract

Kaffir lime peels (Citrus hystrix DC.) have been reported that it has activity on HeLa cell. The purpose of this study was to determine the cytotoxic activity of ethanol extract, ethanolic, ethyl acetate, and hexane fraction of kaffir lime peels to T47D breast cancer cells and to identify the compounds of kaffir lime peels (Citrus hystrix DC.). Extraction was done by maceration using 96% ethanol. The results of thick extracts were fractionated by the liquid-liquid partition method using solvent with different polarity, namely hexane, ethyl acetate, and ethanol. Cytotoxic activity tests were carried out using the MTT assay. Identification of compounds were carried out by Thin Layer Chromatography (TLC) method with silica gel GF 254 as a stationary phase. The mobile phase used was hexane:ethylacetate (6:4) for ethanol extract, ethyl acetate and hexane fractions, and hexane:ethylacetate (4:6) for ethanol fractions. IC₅₀ ethanol extract, ethyl acetate and hexane fractions obtained were 268.49, 286.82, and 136.27 μ g/mL respectively. Ethanol extract, ethyl acetate, and hexane fractions contain alkaloid, flavonoid, terpenoid and phenolic compounds, while the ethanol fraction contains only flavonoid compound. Cytotoxic results of ethanol extract, ethanol, ethyl acetate, and hexane fraction of kaffir lime peels did not active against T47D breast cancer cells.

Keywords: *Citrus hystrix* DC., fractionation, T47D, IC₅₀

PENDAHULUAN

Kanker adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh pertumbuhan dan proliferasi sel yang tidak terkontrol. Salah satu jenis kanker adalah kanker payudara. Kanker

payudara merupakan kanker yang terjadi pada lapisan sel duktus atau lobulus yang berfungsi untuk mengalirkan cairan susu (Kabel dan Baali, 2015). Di Indonesia, kanker payudara merupakan kanker yang paling banyak terjadi

(KPKN, 2016). Prevalensi kanker payudara di Indonesia sebesar 0,5% atau sekitar 61.682 orang (Kemenkes RI, 2016).

Terapi kanker payudara diberikan kepada pasien berdasarkan pada stadium kanker yang dideritanya. Pilihan terapi yang dapat digunakan untuk pasien kanker payudara antara lain kemoterapi, terapi target atau terapi biologi, radioterapi, dan pembedahan (KPKN, 2016). Akan tetapi, kebanyakan obat antikanker bersifat tidak selektif dan memiliki efek yang tidak diinginkan. Efek yang tidak diinginkan yang sering timbul antara lain mual, muntah, rambut rontok, dan sakit kepala (Aslam *et al.*, 2014). Agen kemoterapi kanker seperti doksorubisin memiliki efek samping yang berupa kardiotoxicitas (Carvalho *et al.*, 2009). Selain itu, adanya resistensi sel kanker terhadap agen kemoterapi kanker mendorong pengembangan terapi obat kanker yang berasal dari bahan alam yaitu kulit jeruk purut (*Citrus hystrix* DC.).

Kulit jeruk purut (*Citrus hystrix* DC.) mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, terpenoid, dan saponin (Nathanael *et al.*, 2015). Flavonoid memiliki aktivitas sebagai antioksidan dan antikanker (Devy, dkk. 2010 dan Tripoli *et al.*, 2006). Kandungan minyak atsiri dalam daun jeruk purut memiliki aktivitas antibakteri (Yuliani, *et al.*, 2011). Ekstrak etanol kulit jeruk purut telah diteliti terhadap sel HeLa yang merupakan sel kanker leher rahim dengan nilai IC_{50} sebesar 873,277 $\mu\text{g/mL}$ (Nathanael *et al.*, 2015). Fraksi etil asetat daunnya memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel leukemia HL60 dengan nilai IC_{50} sebesar 19 $\mu\text{g/mL}$ (Chueahongthong *et al.*, 2011). Pada penelitian ini dilakukan pengujian terhadap sel T47D yang merupakan sel kanker payudara mengingat tingginya prevalensi kanker payudara dan belum adanya penelitian mengenai potensi kulit jeruk purut terhadap sel kanker payudara T47D. Selain itu, pada penelitian ini juga dilakukan fraksinasi untuk lebih mengidentifikasi kandungan kimia dan aktivitas sitotoksik kulit jeruk purut.

METODE PENELITIAN

Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi. Kulit jeruk purut yang telah kering dan halus sebanyak 180 g dimaserasi dengan menggunakan 600 mL etanol 96% selama empat hari. Filtrat hasil maserasi disaring dengan vakum Buchner dan diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator*. Ekstrak cair kulit jeruk purut dipekatkan dengan *waterbath* hingga didapat ekstrak kental. Remaserasi dilakukan sebanyak dua kali. Rendemen yang diperoleh kemudian dihitung.

Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan dengan metode partisi menggunakan tiga pelarut yang berbeda kepolarannya. Pelarut yang digunakan yaitu heksana, etil asetat, dan etanol. Fraksinasi diawali dengan melarutkan ekstrak kental sebanyak 5,02 g dengan akuades dan etanol perbandingan (1:1) sebanyak 50 mL. Setelah itu, ekstrak difraksinasi dengan heksana sampai terbentuk dua lapisan yang terpisah menggunakan corong pisah. Lapisan atas sebagai fraksi heksana dan lapisan bawah difraksinasi kembali dengan menggunakan etil asetat. Fraksinasi dengan etil asetat juga akan membentuk dua lapisan yang terpisah. Lapisan atas sebagai fraksi etil asetat dan lapisan bawah sebagai fraksi etanol. Fraksinasi dilakukan dengan memasukkan volume heksana dan etil asetat setiap 50 mL sampai fraksi berwarna bening. Setelah diperoleh fraksi heksana, etil asetat, dan etanol diuapkan pelarutnya dengan menggunakan *rotary evaporator* dan dipekatkan dengan *waterbath* hingga diperoleh fraksi kental. Kemudian dihitung rendemen dari masing-masing fraksi.

Uji Sitotoksik

Uji sitotoksik diawali dengan mengkultur sel pada media kultur RPMI (*Rosewell Park Memorial Institute*) yang mengandung FBS 10% v/v (*Fetal Bovine Serum*), penisilin-streptomisin 1% v/v, dan fungizon 0,05% v/v kemudian diinkubasi pada inkubator CO_2 5% suhu 37°C. Setelah itu, dilakukan pemanenan

sel. Sel yang dipanen harus sudah 80% konfluen. Panen sel dilakukan dengan membuang media dan mencuci sel dengan PBS sebanyak 5 mL. Pada sel ditambahkan tripsin-EDTA (tripsin 0,25%) sebanyak 450 μ L dan diinkubasi selama 5 menit. Kemudian, ditambahkan media RPMI sebanyak 5 mL untuk menginaktivkan tripsin. Sel diresuspensi agar tidak menggerombol dan diamati keadaannya dengan mikroskop. Setelah itu, dilakukan perhitungan sel dengan cara memasukkan 10 μ L sel ke dalam *hemacytometer* yang terdiri atas empat kamar hitung. *Hemacytometer* diletakkan di bawah mikroskop dan kemudian dihitung selnya dengan menggunakan *counter*. Berikut ini cara untuk menghitung jumlah sel:

$$\text{Jumlah sel terhitung/mL} = \frac{(\sum \text{sel kamar A-D})}{4} \times 10^4 \quad (1)$$

$$\text{Jumlah panen sel yang ditransfer} = \frac{\text{Jumlah total sel yang dibutuhkan}}{\text{Jumlah sel terhitung/mL}} \quad (2)$$

Selanjutnya, sel T47D dengan kepadatan 10^4 ditransfer sebanyak 100 μ L ke dalam *plate 96 well* kecuali pada kontrol media kemudian diinkubasi pada inkubator CO₂ 5% selama 24 jam. Setelah itu, ekstrak etanol, fraksi etanol, etil asetat, dan heksana dengan seri konsentrasi 500 μ g/mL, 250 μ g/mL, 125 μ g/mL, 62,5 μ g/mL, dan 31,25 μ g/mL dimasukkan ke dalam sumuran dan diinkubasi pada inkubator CO₂ 5% selama 24 jam. Setelah 24 jam, media dibuang dan ditambahkan reagen MTT sebanyak 100 μ L di setiap sumuran lalu diinkubasi pada inkubator CO₂ 5% selama 4 jam. Setelah itu, pada tiap sumuran ditambahkan SDS 10% dalam 0,1 N HCl sebanyak 100 μ L dan diinkubasi pada inkubator CO₂ 5% selama semalam. Setelah semalam, dilakukan pembacaan absorbansi dengan *ELISA reader* λ 550 nm. Hasil absorbansi digunakan untuk menghitung persentase sel hidup.

$$\text{Persentase Sel Hidup} = \frac{\text{Abs.perlakuan} - \text{Abs.kontrol media}}{\text{Abs.kontrol sel} - \text{Abs.kontrol media}} \times 100\% \quad (3)$$

Setelah itu dihitung regresi linier antara log konsentrasi vs persentase sel hidup. Setelah didapatkan persamaan regresi linier ($y=Bx+A$), dihitung IC₅₀ dengan cara memasukkan nilai 50% pada y kemudian dicari antilog dari nilai x pada persamaan regresi linier tersebut.

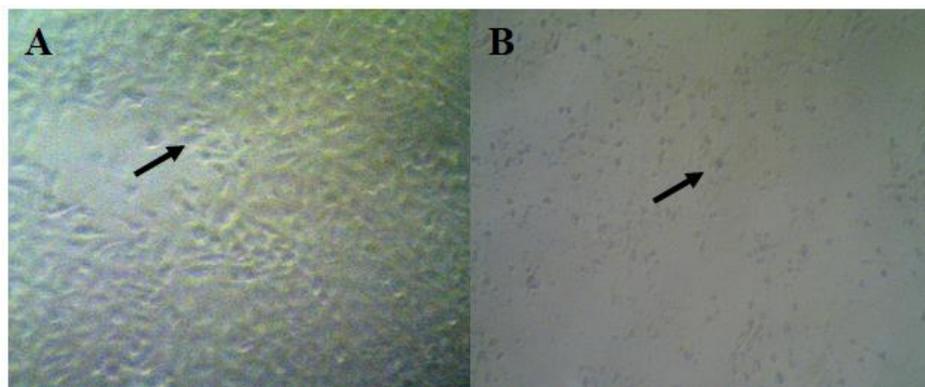
Identifikasi Senyawa

Identifikasi senyawa dilakukan untuk mengetahui senyawa golongan tertentu yang terdapat dalam ekstrak etanol, fraksi etanol, etil asetat, dan heksana kulit jeruk. Penggolongan senyawa dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Sampel yang berupa ekstrak dan fraksi dilarutkan terlebih dahulu menggunakan pelarutnya dan ditotolkan ke fase diam dan kemudian dielusikan dengan fase gerak. Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF 254, dan fase gerak yang digunakan yaitu heksana:etil asetat (6:4) dalam 10 mL untuk ekstrak etanol, fraksi etil asetat, dan heksana, serta heksana:etil asetat (4:6) dalam 10 mL untuk fraksi etanol. Setelah terelusi, sampel disemprot dengan reagen semprot seperti Dragendorf, FeCl₃, anisaldehyd-H₂SO₄, dan sitroborat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Maserasi merupakan metode ekstraksi yang dilakukan dengan cara merendam sampel dalam pelarut (Saifudin, 2014). Pelarut yang digunakan untuk memaserasi sampel yaitu etanol 96%. Etanol 96% dipilih karena mempunyai daya ekstraksi yang luas yaitu mampu menyari berbagai senyawa yang ada dalam saampel (Saifudin, 2014). Ekstrak cair kemudian diupkan pelarutnya dengan rotary evaporator dan dipekatkan dengan waterbath. Remaserasi dilakukan sebanyak dua kali. Ekstrak kental yang diperoleh sebanyak 23,60 g dengan rendemennya sebesar 13,10%.

Fraksinasi ekstrak etanol kulit jeruk purut dilakukan dengan metode partisi. Fraksinasi



Gambar 1. Morfologi sel T47D pada kontrol sel (A) dan sel yang mengalami kematian karena adanya perlakuan fraksi jeruk purut (B)

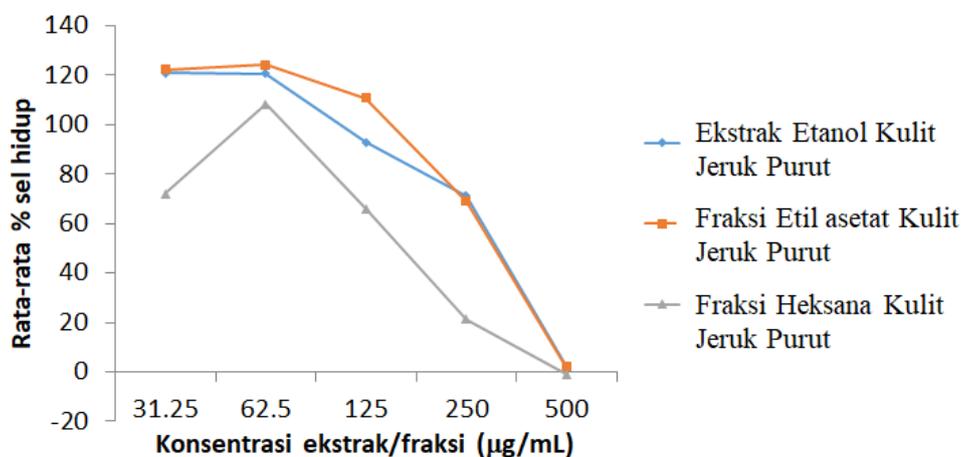
dilakukan menggunakan pelarut heksana, etil asetat, dan etanol. Rendemen yang diperoleh untuk fraksi heksana sebesar 21,51%, fraksi etil asetat sebesar 24,50%, dan fraksi etanol sebesar 11,75%. Diketahui bahwa rendemen fraksi terbesar yang diperoleh adalah fraksi etil asetat dan yang terendah adalah fraksi etanol.

Uji sitotoksik ekstrak etanol, fraksi etanol, etil asetat, dan heksana kulit jeruk purut terhadap sel kanker payudara T47D dilakukan dengan metode MTT assay. Prinsip metode MTT assay adalah mereduksi garam tetrazolium MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) oleh enzim suksinat reduktase dalam mitokondria sel

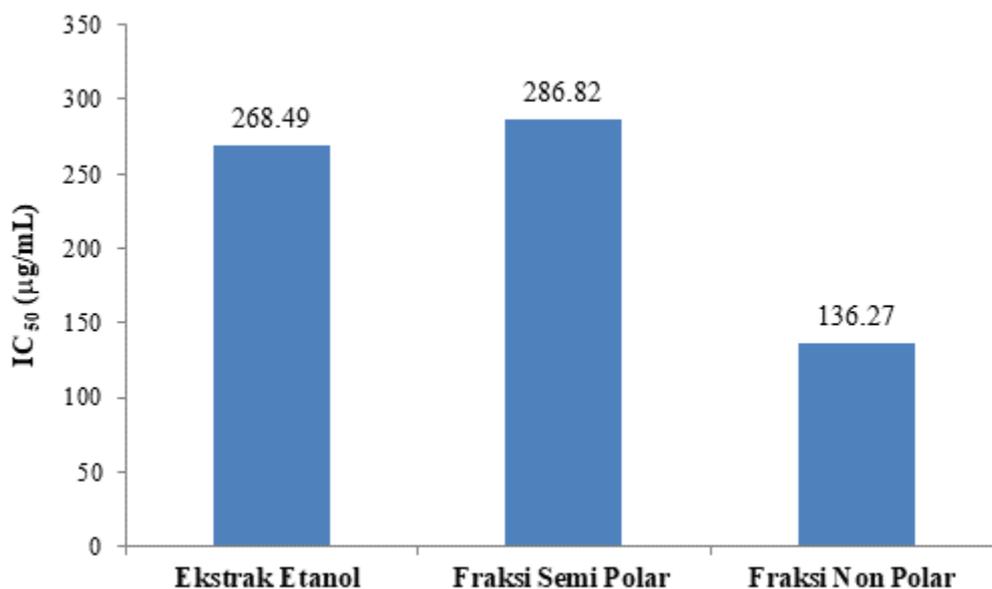
hidup yang akan membentuk kristal formazan berwarna ungu. Penambahan SDS dalam HCl akan melarutkan kristal formazan yang berwarna ungu sehingga dapat dibaca absorbansinya dengan ELISA reader (CCRC, 2009).

Adapun morfologi sel T47D yang telah diberikan perlakuan ekstrak mengalami kematian berbentuk bulatan kecil (Gambar 1).

Hasil uji sitotoksik diperoleh dari pembacaan absorbansi pada ELISA reader (Gambar 2). Sel yang hidup akan mempunyai absorbansi yang tinggi karena adanya pembentukan kristal formazan yang berwarna ungu (CCRC, 2009) sehingga % sel hidup akan tinggi. Hasil uji sitotoksik dari ekstrak



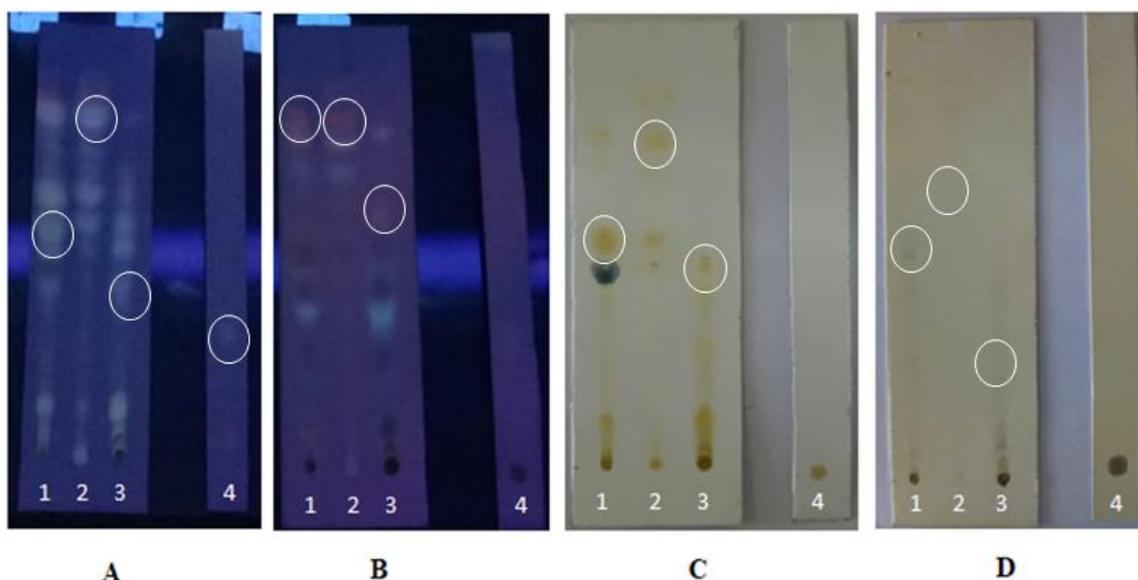
Gambar 2. Pengaruh pemberian ekstrak etanol, fraksi etil asetat, dan heksana kulit jeruk purut terhadap rata-rata persentase sel hidup T47D



Gambar 3. Hasil IC₅₀ ekstrak etanol, fraksi etil asetat, dan heksana kulit jeruk purut

etanol, fraksi etil asetat, dan heksana kulit jeruk purut menunjukkan bahwa konsentrasi berbanding terbalik dengan persentase sel hidup. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol, fraksi etil asetat, dan heksana kulit jeruk purut maka akan semakin kecil % sel hidupnya.

Ekstrak etanol kulit jeruk purut memiliki nilai IC₅₀ sebesar 268,49 µg/mL. Fraksi etil asetat kulit jeruk purut mempunyai nilai IC₅₀ sebesar 286,82 µg/mL. Fraksi heksana kulit jeruk purut mempunyai nilai IC₅₀ sebesar 136,27 µg/mL (Gambar 3). Hasil IC₅₀ fraksi



Gambar 4. Hasil KLT ekstrak etanol, fraksi heksana, etil asetat, dan etanol kulit jeruk purut yang telah disemprot Sitroborat pada UV 366 nm (A); Anisaldehyd-H₂SO₄ pada UV 366 nm (B); Dragendorff pada sinar tampak (C); FeCl₃ pada sinar tampak (D).
1 (ekstrak etanol kulit jeruk purut); 2 (fraksi heksana kulit jeruk purut); 3 (fraksi etil asetat kulit jeruk purut); 4 (fraksi etanol kulit jeruk purut)

Tabel 1. Hasil deteksi golongan senyawa yang terdapat pada ekstrak etanol, fraksi etanol, etil asetat, dan heksana kulit jeruk purut

Reagen	Senyawa (Hasil deteksi)	Ekstrak etanol	Fraksi Heksana	Fraksi Etil Asetat	Fraksi Etanol
Sitroborat	Flavonoid (Kuning-kehijauan)	+	+	+	+
Anisaldehyd-H ₂ SO ₄	Terpenoid (Kuning-merah tua)	+	+	+	-
Dragendorff	Alkaloid (Kuning-kecoklatan)	+	+	+	-
FeCl ₃	Fenolik (Hitam)	+	+	+	-

heksana kulit jeruk purut dua kali lebih kecil daripada ekstrak etanol dan fraksi etil asetat. Potensi antikanker berdasarkan National Cancer Institute (NCI) Amerika yaitu aktif apabila nilai $IC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$, moderat aktif apabila nilai $IC_{50} 30-100 \mu\text{g/mL}$, dan tidak aktif apabila nilai $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ (Abubakar, 2016). Pada penelitian ini, ekstrak etanol, fraksi etil asetat, dan heksana kulit jeruk tidak memiliki aktivitas sitotoksik karena nilai $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$.

Hasil uji sitotoksik fraksi etanol kulit jeruk purut pada konsentrasi $500 \mu\text{g/mL}$ menunjukkan persentase sel hidup yang tinggi yaitu 115,98%. Konsentrasi $250 \mu\text{g/mL}$, $125 \mu\text{g/mL}$, $62,5 \mu\text{g/mL}$, $31,25 \mu\text{g/mL}$ menunjukkan persentase sel hidup yang hampir sama. Berdasarkan data ini, dapat dikatakan bahwa fraksi etanol kulit jeruk purut tidak dapat membunuh sel kanker payudara T47D sehingga fraksi etanol tidak memiliki aktivitas sitotoksik. Hal ini diduga karena tidak adanya senyawa aktif yang tersari pada fraksi etanol kulit jeruk purut.

Identifikasi senyawa dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang

kemudian disemprot dengan berbagai reagen semprot untuk membantu memvisualisasikan bercak pada sinar tampak dan UV 366 nm (Gambar 4). Hasil deteksi golongan senyawa yang terdapat pada ekstrak etanol, fraksi etanol, etil asetat, dan heksana kulit jeruk purut dapat dilihat pada Tabel 1 dan Gambar 5. Hasil yang didapatkan dari penggolongan senyawa yaitu ekstrak etanol kulit jeruk purut mengandung senyawa golongan flavonoid, terpenoid, alkaloid, dan fenolik sama dengan hasil penelitian Nathanael, et al. (2015). Fraksi etil asetat dan heksana juga mengandung senyawa golongan flavonoid, terpenoid, alkaloid, dan fenolik, sedangkan fraksi etanol hanya mengandung senyawa golongan flavonoid. Hasil identifikasi golongan senyawa yang terkandung dalam kulit jeruk purut ini berkorelasi dengan aktivitas sitotoksiknya. Ekstrak dan fraksi kulit jeruk purut yang memiliki kandungan senyawa flavonoid, terpenoid, alkaloid, dan fenolik memiliki IC_{50} tertentu meskipun tidak aktif, sedangkan fraksi etanol yang hanya mengandung flavonoid tidak mampu menghambat pertumbuhan sel T47D.

KESIMPULAN

Pada penelitian ini, dapat ditarik kesimpulan bahwa ekstrak etanol, fraksi etil asetat, heksana, dan etanol kulit jeruk purut tidak aktif terhadap sel kanker payudara

T47D. Ekstrak etanol, fraksi etil asetat, dan heksana kulit jeruk purut memiliki kandungan senyawa flavonoid, terpenoid, alkaloid, dan fenolik, sedangkan fraksi etanol jeruk purut hanya mengandung senyawa flavonoid.

Daftar Pustaka

- Abubakar A.N.F., 2016, Triterpenoid Biji Alpukat (*Persea americana*) Dan Aktivitas Sitotoksiknya Terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7 Dan Hati HepG2, *Tesis*, Institut Pertanian Bogor.
- Aslam M.S., Naveed S., Ahmed A., Abbas Z., Gull I., and Athar M.A., 2014, Side Effects of Chemotherapy in Cancer Patients and Evaluation of Patients Opinion about Starvation Based Differential Chemotherapy, *Journal of Cancer Therapy*, 5, 817-822.
- Carvalho C., Renato X.S., Susana C., Sonia C., Paulo J.O., Maria S., Paula I.M., 2009, Doxorubicin: The Good, The Bad, and The Ugly Effect, *Current Medicinal Chemistry*, 16 (25).
- CCRC, 2009, Prosedur Tetap Uji Sitotoksik Metode MTT, *Cancer Chemoprevention Resesarch Center Farmasi UGM Yogyakarta*, 6-9.
- Chueahongthong F., Ampasavate C., Okonogi S., Tima S., Anuchapreeda S., 2011, Cytotoxic effects of crude kaffir lime (*Citrus hystrix*, DC.) leaf fractional extracts on leukemic cell lines, *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(14), 3097-3105.
- Devy N.F., Yulianti F., dan Andrini., 2010, Kandungan Flavonoid dan Limonoid pada Berbagai Fase Pertumbuhan Tanaman Jeruk Kalamondin (*Citrus mitis* Blanco) dan Purut (*Citrus hystrix* DC.), *Jurnal Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika*, 20 (1), 360-367.
- Kabel A.M., Baali F.H., 2015, Breast Cancer: Insights into Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis, and Management, *Journal of Cancer Research and Treatment*, 3 (2), 28-33.
- Kemendes RI, 2016, *Info Datin Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI*.
- Komite Penanggulangan Kanker Nasional (KPKN), 2016, *Panduan Penatalaksanaan Kanker Payudara*, Kemendes RI, Jakarta.
- Nathanael J., Wijayanti N., dan Atmodjo P.K., 2015, Uji Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Kulit Jeruk Purut (*Citrus hystrix*) pada Sel HeLa *Cervical Cancer Line*, *Jurnal Teknobiologi*.
- Saifudin A, 2014, *Senyawa Alam Metabolit Sekunder Teori, Konsep, dan Teknik Pemurnian*, Penerbit Deepublish, Yogyakarta.
- Tripoli E., Guardia, M.L., Giammanco S., Majo D.D., and Giamanco M., 2007, Citrus Flavonoids: Molecular Structure, Biological Activity and Nutritional Properties: A Review, *Food Chem*, 104, 466-479.
- Yuliani R., Indrayudha P., dan Sriandita S., 2011, Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, *Pharmakon*, 12 (2).