

---

**AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL DAUN SIRIH  
(*Piper betle*) TERHADAP SEL T47D**

CYTOTOXIC ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACT OF *Piper betle* LEAVES AGAINST  
T47D CELLS

**Ratna Yuliani, Prastiwi Wulaning Tyas**

Fakultas Farmasi

Universitas Muhammadiyah Surakarta

Jl. A. Yani Tromol Pos I, Pabelan, Kartasura, Surakarta

\*Email: ratna.yuliani@ums.ac.id

**ABSTRAK**

*Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik ekstrak etanol daun sirih (*Piper betle*) terhadap sel kanker payudara T47D dan mengidentifikasi golongan senyawa yang terkandung di dalam ekstrak. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan etanol 96% sebagai penyari. Aktivitas sitotoksik ekstrak etanol daun sirih diuji menggunakan metode MTT. Golongan senyawa yang terkandung di dalam ekstrak diidentifikasi dengan metode kromatografi lapis tipis dengan fase diam silika gel GF254 dan fase gerak campuran n-heksan dan etil asetat (7:3). Hasil uji sitotoksik menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirih mampu menurunkan persentase sel T47D hidup dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 265,24 µg/mL. Ekstrak etanol daun sirih mengandung golongan senyawa alkaloid, glikosida jantung, tanin, terpenoid, dan saponin.*

**Kata Kunci:** ekstrak, kanker, sirih, sitotoksik.

**ABSTRACT**

*This study aims to investigate the cytotoxic activity of ethanolic extract of betel leaves (*Piper betle*) against breast cancer cells, T47D and identify natural compounds in the extract. Extraction was done by maceration method using 96% ethanol. Cytotoxic activity of the ethanolic extract of betel leaves was tested using the MTT method. The compounds in the extract were identified by thin layer chromatography method with silica gel GF254 as the stationary phase and mixture of n-hexane and ethyl acetate (7: 3) as the mobile phase. The cytotoxic test results showed that the ethanolic extract of betel leaves decreases the percentage of living T47D cells with an IC<sub>50</sub> value of 265.24 µg/mL. Ethanolic extract of betel leaves contains alkaloids, cardiac glycosides, tannins, terpenoids, and saponins.*

**Key Words:** betel, cancer, cytotoxic, extract

## PENDAHULUAN

Kanker payudara adalah keganasan yang berasal dari jaringan payudara (Wells *et al.*, 2009). Kanker tersebut paling banyak terjadi pada perempuan, 1 banding 3 dari semua keganasan pada perempuan (Richie & Swanson, 2003). Sebanyak 1,5 juta perempuan menderita kanker payudara setiap tahun dan kanker payudara merupakan penyebab kematian terbesar pada perempuan. Pada tahun 2015 sebanyak 570.000 perempuan meninggal akibat kanker payudara. Secara global, angka kejadian kanker payudara terus meningkat (WHO, 2017). Pada tahun 2018, kematian perempuan akibat kanker payudara meningkat menjadi 626.679 (International Agency for Research on Cancer, 2019). Di Indonesia, sebanyak 61.682 penduduk menderita kanker payudara pada tahun 2013 (Kemenkes RI, 2015). Kanker payudara dapat diterapi menggunakan obat-obat antikanker tetapi obat-obat tersebut menyebabkan banyak efek samping.

Adanya reaksi obat yang tidak diinginkan selama pengobatan menggunakan obat antikanker merupakan masalah global dan belum dapat dihindari. Reaksi obat yang tidak diinginkan dapat berkisar dari mual, muntah atau reaksi sedang lain sampai myelosuppression yang parah. Pasien yang menerima obat antikanker (fluorourasil + doksorubisin + siklofosfamid) selama pengobatan kanker payudara mengalami kerontokan rambut, perubahan warna kuku, perubahan indera perasa, penurunan nafsu makan, mual, dan ketidaknormalan syaraf (Saini *et al.*, 2015). Efek samping obat tersebut seyogyanya tidak dirasakan oleh pasien sehingga diperlukan obat-obat antikanker yang lebih aman terkait efek samping obat. Salah satu sumber untuk menemukan senyawa antikanker adalah tanaman.

Tanaman banyak mengandung metabolit sekunder yang mempunyai berbagai aktivitas farmakologi. Sirih

(*Piper betle*) telah diteliti kandungan senyawa dan aktivitas sitotoksiknya terhadap beberapa sel. Paranjpe *et al.* (2013) melaporkan bahwa salah satu fraksi hasil *bioguided fractionation* ekstrak metanol daun sirih dapat menghambat proliferasi sel kanker prostat lebih kuat dibandingkan ekstraknya. Ekstrak etanol daun sirih mempunyai sitotoksitas terhadap sel Ehrlich Ascites Carcinoma (EAC), Raji, melanoma B-16, dan HeLa (Roy & Vijayalaxmi, 2013). Ekstrak metanol daun sirih juga dapat menyebabkan kematian pada beberapa sel kanker payudara seperti MCF-7, MDA-MB-468, dan MDA-MB-468 (Sriwiriyajan *et al.*, 2014).

Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas sitotoksik ekstrak etanol daun sirih terhadap sel kanker payudara T47D dan mengidentifikasi golongan senyawa yang terkandung di dalam ekstrak.

## METODE

### Alat:

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain neraca analitik (Adventurer), almari pengering, *rotary evaporator* (Heidolph), penangas air (Memmert), vorteks (Thermolyne Corporation), autoclaf (Hirayama), oven (Memmert), inkubator CO<sub>2</sub> (Binder), *cytoculture* (ESCO), alat-alat gelas, blender, sentrifus (PLC Series), hemositometer, mikroskop (Olympus), ELISA reader (BioTek), mikropipet (Socorex), dan lampu UV (254 nm dan 366 nm).

### Bahan:

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain daun sirih (dari Boyolali), media Roswell Park Memorial Institute (RPMI), penisilin, streptomisin, tripsin, fungizon, sodium dodesil sulfat (SDS), *fetal bovine serum* (FBS), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida (MTT), *phosphate buffered saline*

(PBS), etanol 70%, etanol 96%, akuades, dimetil sulfoksida (DMSO), lempeng silika gel GF254, heksan, etil asetat, sitroborat, anisaldehid-asam sulfat,  $\text{FeCl}_3$ , Dragendorff, KOH, asam sulfat, 96-well plate, dan conical tube.

#### Cara kerja:

##### Ekstraksi

Seratus gram serbuk daun sirih direndam dalam 1 L etanol 96% selama 3 hari sambil sesekali diaduk. Maserat dipisahkan dari ampas dengan cara disaring menggunakan kertas saring dan corong Buchner. Penyari dalam maserat diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dan *waterbath* pada suhu 60°C hingga mendapatkan ekstrak kental.

##### Uji sitotoksik dengan metode MTT

Sel T47D dimasukkan ke dalam 96-well plate dengan kepadatan  $5 \times 10^4$  sel/sumuran dan disisakan 3 sumuran kosong untuk kontrol media. Sel diinkubasi di dalam inkubator  $\text{CO}_2$  pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, media dibuang dan sel dicuci dengan PBS sebanyak 100  $\mu\text{L}$  tiap sumuran. Setelah PBS dibuang, ekstrak dengan 6 konsentrasi, DMSO, dan doksorubisin dengan 6 konsentrasi dimasukkan ke dalam sumuran yang berisi sel. Sel diinkubasi di dalam inkubator  $\text{CO}_2$  pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, media dibuang dan MTT (0,5 mg/mL) sebanyak 100  $\mu\text{L}$  dimasukkan ke dalam tiap sumuran. Sel diinkubasi lagi selama 2-4 jam di dalam inkubator  $\text{CO}_2$  pada suhu 37°C. Selanjutnya sebanyak 100  $\mu\text{L}$  larutan SDS 10% dalam 0,01 N HCl (reagen stopper) dimasukkan ke dalam tiap sumuran. Plate dibungkus aluminium foil dan diinkubasi di tempat gelap pada suhu kamar selama semalam. Serapan larutan dalam sumuran dibaca menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 550 nm.

##### Kromatografi lapis tipis (KLT)

Lima puluh milligram ekstrak dilarutkan pada 1 mL etanol lalu ditotolkan ke lempeng silika gel sebanyak beberapa kali. Selanjutnya lempeng dielusi menggunakan fase gerak campuran n-heksan dan etil asetat (7:3) dengan jarak elusi 8 cm. Lempeng dibiarkan pada suhu ruang hingga fase gerak menguap semua. Lempeng diamati di bawah sinar tampak, UV 254 nm, dan UV 366 nm. Lempeng disemprot reagen sitroborat, anisaldehid-asam sulfat,  $\text{FeCl}_3$ , Dragendorff, KOH, dan asam sulfat untuk mendeteksi golongan senyawa yang terkandung di dalam ekstrak.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji aktivitas sitotoksik ekstrak etanol daun sirih dilakukan dengan metode MTT. Pada sel dengan metabolisme yang aktif, MTT akan diubah menjadi formazan yang berwarna ungu. Kemampuan untuk mengubah MTT menjadi formazan akan hilang jika sel mati sehingga perubahan MTT menjadi formazan dapat dijadikan sebagai penanda bahwa sel masih hidup (Riss *et al.*, 2016). Intensitas warna ungu yang dihasilkan sebanding dengan banyaknya sel hidup. Semakin banyak sel hidup, semakin tinggi intensitas warna ungu (Putri, 2013).

Dalam penelitian ini, ekstrak etanol daun sirih dan doksorubisin sebagai kontrol positif diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel T47D. Hasil uji menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirih dan doksorubisin dapat menurunkan persentase sel hidup (Tabel 1). Hal tersebut mengindikasikan bahwa kedua bahan tersebut mampu membunuh sel T47D. Ekstrak etanol daun sirih mempunyai nilai  $\text{IC}_{50}$  sebesar 265,24  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sedangkan nilai  $\text{IC}_{50}$  doksorubisin sebesar 24,77  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Walaupun ekstrak etanol daun sirih mampu membunuh sel T47D, tetapi nilai  $\text{IC}_{50}$ -nya yang jauh lebih kecil dibandingkan nilai  $\text{IC}_{50}$  doksorubisin menunjukkan bahwa aktivitas sitotoksiknya terhadap sel T47D jauh lebih lemah dibandingkan doksorubisin.

Pada penelitian lain, ekstrak etanol daun sirih telah diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap beberapa sel. Ekstrak alkoholik daun sirih dapat menghambat pertumbuhan sel HeLa dan sel Raji dengan nilai IC<sub>50</sub> berturut-turut sekitar 80 µg dan 45 µg. Ekstrak tersebut ternyata juga bersifat toksik terhadap sel normal (sel Raji) sehingga bersifat tidak selektif (Roy & Vijayalaxmi, 2013). Ekstrak metanol daun sirih juga telah diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap beberapa sel kanker payudara yaitu sel MCF-7, MDA-MB-468, MCF-12A, dan MDA-

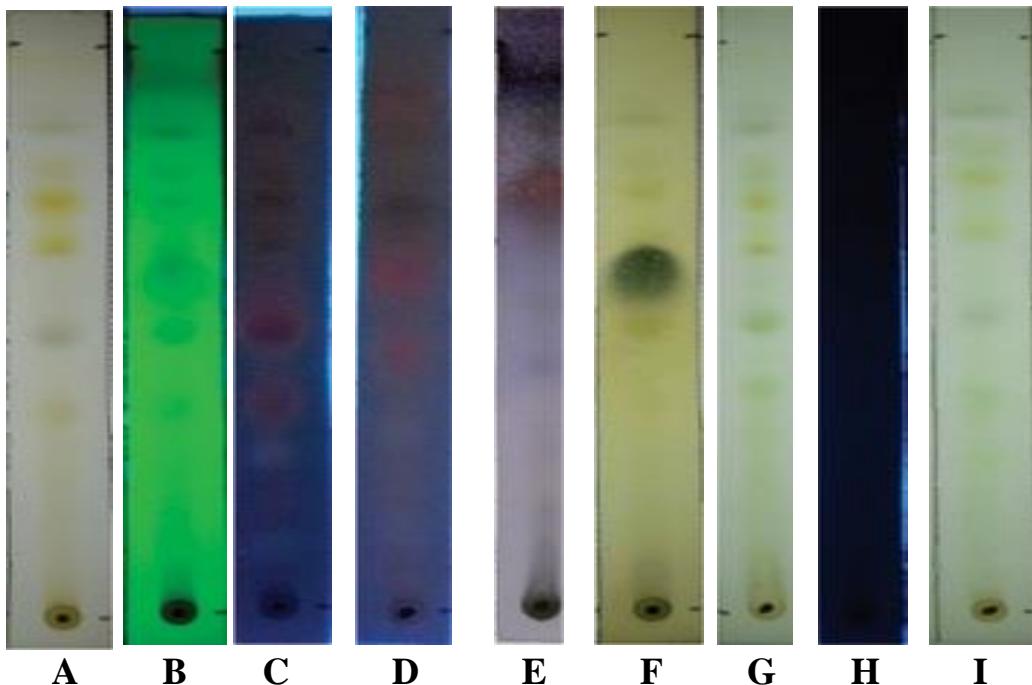
MB-321 dengan nilai IC<sub>50</sub> berturut-turut sebesar 19,30 µg/mL, 20,83 µg/mL, > 80 µg/mL, dan 38,25 µg/mL (Sriwiriyajan *et al.*, 2014). Ekstrak air daun sirih menunjukkan nilai CTC<sub>50</sub> (*cytotoxic concentration*) sebesar 96,25 µg/mL terhadap sel Hep-2 (Chaurasia *et al.*, 2010). Ekstrak etanol daun sirih pada penelitian ini mempunyai aktivitas yang paling rendah dibandingkan pada penelitian lain. Hal ini menunjukkan bahwa sel kanker payudara T47D yang digunakan tidak sensitif terhadap ekstrak etanol daun sirih.

**Tabel 1. Hasil uji sitotoksik ekstrak etanol daun sirih dan doksorubisin terhadap sel T47D**

Bahan Uji	Konsentrasi (µg/mL)	Log Konsentrasi	Rata-Rata Sel Hidup (%)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
Doksorubisin	3,125	0,495	67,70	
	6,25	0,796	65,48	
	12,5	1,097	63,72	
	25	1,398	59,12	24,77
	50	1,699	47,34	
	100	2,000	27,07	
	200	2,301	18,76	
Ekstrak etanol daun sirih	25	1,398	83,48	
	50	1,699	98,01	
	100	2,000	91,22	
	200	2,301	59,07	265,24
	400	2,602	21,27	
	800	2,903	29,63	

Kemampuan ekstrak daun sirih untuk menurunkan persentase sel hidup disebabkan adanya metabolit sekunder yang terkandung di dalam ekstrak tersebut. Dalam penelitian ini, golongan senyawa di dalam ekstrak diidentifikasi menggunakan metode KLT. Hasil KLT menunjukkan bahwa di dalam ekstrak etanol daun sirih terdeteksi adanya beberapa golongan senyawa. Munculnya warna merah dan biru pada bercak setelah disemprot anisaldehid-asam sulfat menunjukkan bahwa ekstrak mengandung terpenoid dan saponin. Reagen FeCl<sub>3</sub> dapat mendeteksi

tanin di dalam ekstrak yang ditandai dengan warna biru tua pada bercak. Ekstrak juga mengandung alkaloid yang ditunjukkan dengan adanya bercak yang berwarna coklat setelah disemprot reagen Dragendorff. Penyemprotan dengan asam sulfat memunculkan bercak berwarna biru yang mengindikasikan bahwa ekstrak mengandung glikosida jantung (Gambar 1). Dalam penelitian ini, ekstrak etanol daun sirih mengandung senyawa golongan terpenoid, saponin, tanin, alkaloid, dan glikosida jantung.



Gambar 1. Hasil kromatografi lapis tipis ekstrak etanol daun sirih menggunakan fase diam silika gel GF254 dan fase gerak campuran heksan dan etil asetat (7:3). Lempeng sebelum disemprot dilihat di bawah sinar tampak (A), lempeng sebelum disemprot dilihat di bawah sinar UV 254 nm (B), lempeng sebelum disemprot dilihat di bawah sinar UV 366 nm (C), lempeng setelah disemprot sitroborat dilihat di bawah sinar UV 366 nm (D), lempeng setelah disemprot anisaldehid-asam sulfat dilihat di bawah sinar tampak (E), lempeng setelah disemprot  $\text{FeCl}_3$  dilihat di bawah sinar tampak (F), lempeng setelah disemprot Dragendorff dilihat di bawah sinar tampak (G), lempeng setelah disemprot KOH dilihat di bawah sinar UV 366 nm, dan lempeng setelah disemprot asam sulfat dilihat di bawah sinar tampak.

Beberapa penelitian telah mengidentifikasi senyawa-senyawa yang terkandung dalam daun sirih. Ekstrak etanol daun sirih mengandung fitosterol, flavonoid, alkaloid, tanin, dan fenol (Saini *et al.*, 2016). Kandungan ekstrak tersebut sedikit berbeda dengan hasil penelitian Patil *et al.* (2015) yang menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirih mengandung steroid, diterpen, tanin, flavonoid, kumarin, dan saponin. Kandungan metabolit ekstrak etanol memiliki kemiripan dengan ekstrak metanol daun sirih yang mengandung alkaloid, fenol, flavonoid, tanin, saponin, glikosida, terpenoid, dan steroid. Ekstrak juga mengandung  $\beta$ -kariofilen, eugenol, dan hidroksikavikol sebagai komponen utama (Syahidah *et al.*, 2017).

Perbedaan hasil identifikasi senyawa yang terkandung dalam ekstrak daun sirih kemungkinan disebabkan oleh tempat tumbuh dan varietas tanaman yang diteliti. Daun sirih yang digunakan pada penelitian ini berasal dari Indonesia sedangkan daun sirih yang digunakan pada penelitian lain berasal dari Pakistan, India, dan Malaysia. Perbedaan lingkungan tumbuh tanaman sirih dapat mempengaruhi kandungan metabolit sekundernya (Muttaeb *et al.*, 2018). Patel & Mohan (2017) menemukan bahwa profil senyawa dalam ekstrak daun sirih varietas Banarsi tidak sama dengan profil senyawa dalam ekstrak daun sirih varietas Bengali. Hal tersebut menunjukkan bahwa walaupun spesies tanaman sama tapi kandungan senyawa tidak selalu sama.

Beberapa penelitian telah mengidentifikasi senyawa aktif dalam daun sirih yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antikanker. Fraksi ekstrak metanol daun sirih yang mengandung senyawa hidroksikavikol lebih poten dalam menghambat proliferasi sel kanker prostat (PC-3) dibandingkan fraksi yang mengandung kavibetol (Paranjpe *et al.*, 2013). Hal tersebut mengindikasikan bahwa hidroksikavikol kemungkinan besar mempunyai aktivitas antiproliferasi terhadap sel kanker prostat (PC-3). Gundala *et al.* (2014) melaporkan bahwa hidroksikavikol dapat menghambat kanker

### KESIMPULAN

Ekstrak etanol daun sirih mampu menurunkan persentase sel T47D dengan nilai IC50 sebesar 265,24 µg/mL. Ekstrak tersebut mengandung terpenoid, saponin, tanin, alkaloid, dan glikosida jantung.

### DAFTAR PUSTAKA

- Chaurasia, S., Kulkarni, G.T. & Shetty, L.N. (2010). Phytochemical Studies and in vitro Cytotoxicity Screening of *Piper betle* Leaf (PBL) Extract. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 6(5). 532-536.
- Gundala, S.R., Yang, C., Mukkavilli, R., Paranjpe, R., Brahmbhatt, M., Pannu, V., Cheng, A., Reid, M.D. & Aneja, R. (2014). Hydroxychavicol, a Betel Leaf Component, Inhibits Prostate Cancer Through ROS-Driven DNA Damage and Apoptosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 280(1). 86-96.
- International Agency for Research on Cancer. (2019). *Estimated Number of Incident Cases and Deaths Worldwide, Female, All Ages*. Diunduh dari: [gco.iarc.fr/today/](http://gco.iarc.fr/today/) tanggal 26 Februari 2019.
- Kementerian Kesehatan RI. (2015). Stop Kanker. *InfoDATIN*. 1-6.
- Muttaleb, Q.A., Abdullah, T.L., Hassan, S.A., Rashid, A.A., Taheri, S., Ahmed, O.A. & Abdulameer, D.A. (2018). The Role of Shade and Nitrogen on Physiological Traits and Secondary Metabolites of *Piper betle* L. *Journal of Horticulture*, 5(2). 1-8.
- Paranjpe, R., Gundala, S.R., Lakshminarayana, N., Sagwal, A., Asil, G., Pandey, A. & Aneja, R. (2013). *Piper betle* Leaf Extract: Anticancer Benefits and Bio-Guided Fractionation to Identify Active Principles for Prostate Cancer Management. *Carcinogenesis*, 34(7). 1558-1566.
- Patel, N. & Mohan, J.S.S. (2017). Isolation and Characterization of Potential Bioactive Compounds from *Piper betle* Varieties Banarsi and Bengali Leaf Extract. *International Journal of Herbal Medicine*, 5(5). 182-191.

postat dengan merusak DNA dan menginduksi apoptosis. Hidroksikavikol juga mampu menurunkan viabilitas sel kanker glioma manusia (Rahman *et al.*, 2014). Pada penelitian ini ekstrak etanol daun sirih dapat menurunkan persentase sel T47D hidup tetapi senyawa aktif yang berperan belum dapat ditentukan. Penelitian lebih lanjut menggunakan fraksi dan senyawa yang terisolasi dapat mengungkapkan senyawa aktif dalam ekstrak etanol daun sirih yang mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D.

- Patil, R.S., Harale, P.M., Shivangekar, K.V., Kumbhar, P.P. & Desai, R.R. (2015). Phytochemical Potential and *In Vitro* Antimicrobial Activity of *Piper betle* Linn. Leaf Extracts. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(5). 1095-1101.
- Putri, H. (2013). *Protokol: Uji Sifatoksik Metode MTT*. Cancer Chemoprevention Research Center. Fakultas Farmasi, UGM.
- Rahman, A.A., Jamal, A.R.A., Harun, R., Mokhtar, N.M. & Ngah, W.Z.W. (2014). Gamma-tocotrienol and Hydroxy-Chavicol Synergistically Inhibits Growth and Induces Apoptosis of Human Glioma Cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(213). 1-11.
- Richi, R.C. & Swanson, J.O. (2003). Breast Cancer: A Review of the Literature, *Journal of Insurance Medicine*, 35. 85-101.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2016). Cell Viability Assays, in Sittampalam, G. S. *et al.*, eds. *Assay Guidance Manual*, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD).
- Roy, U.B. & Vijayalaxmi, K.K. (2013). Evaluation of Cytotoxic Activity of *Piper betle* Linn. Using Murine and Human Cell Lines In Vitro. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 4(9). 221-233.
- Saini, S., Dhiman, A. & Nanda, S. (2016). Pharmacognostical and Phytochemical Studies of *Piper betle* Linn Leaf. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8(5). 222-256.
- Saini, V.K., Sewal, R.K., Ahmad, Y. & Medhi, B. (2015). Prospective Observational Study of Adverse Drug Reaction of Anticancer Drugs Used in Cancer Treatment in a Tertiary Care Hospital. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 77(6). 687-693.
- Sriwirijayan, S., Ninpesh, T., Sukpondma, Y., Nasomyon, T. & Graidist, P. (2014). Cytotoxicity Screening of Plants of Genus *Piper* in Breast Cancer Cell Lines. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(6). 921-928.
- Syahidah, A., Saad, C.R., Hassan, M.D., Rukayadi, Y., Norazian, M.H. & Kamarudin, M.S. (2017). Phytochemical Analysis, Identification and Quantification of Antibacterial Active Compounds in Betel Leaves, *Piper betle* Methanolic Extract. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 20(2). 70-81.
- Wells, B.G., Dipiro J.T., Schwinghammer T.I. & Dipiro, C.V. (2009). *Pharmacotherapy Handbook* (7th edition). New York: McGraw Hill.
- WHO. (2017). *Breast Cancer*. Diunduh dari: <http://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/> tanggal 1 November 2017.