

UJI AKTIVITAS ANTIPROLIFERATIF DAN INDUKSI APOPTOSIS EKSTRAK ETANOL RIMPANG LENGKUAS (*Alpinia galanga* L.) TERHADAP SEL MCF-7

ANTI-PROLIFERATIVE ACTIVITY AND APOPTOSIS INDUCTION TEST OF ETANOL EXTRACT OF *Alpinia galanga* L. AGAINST MCF-7 CELLS

Inanda Damantia¹, Muhammad Da'i^{1*}

¹Laboratorium Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Jl A Yani No 157, Sukoharjo, Indonesia

*E-mail: muhammad.dai@ums.ac.id

Abstrak

Rimpang lengkuas telah diketahui mengandung senyawa flavonoid yang berpotensi memiliki aktivitas antikanker. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengkaji adanya aktivitas antikanker ekstrak etanol lengkuas dengan menghambat pertumbuhan sel kanker, menekan proliferasi sel kanker, dan memacu apoptosis sel kanker. Ekstrak etanol rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* L.) diperoleh dari proses ekstraksi serbuk rimpang lengkuas menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Uji sitotoksik dilakukan dengan metode MTT assay dan menggunakan 5 kadar seri konsentrasi, yaitu 500; 250; 125; 62,5; dan 31,25 µg/mL. Hasil uji sitotoksik menunjukkan nilai IC₅₀ sebesar 706,75 µg/mL. Pengamatan pada penghambatan pertumbuhan sel melalui kinetika proliferasi sel dilakukan dengan uji antiproliferatif pada jam ke-24, 48, dan 72. Metode yang digunakan pada uji antiproliferatif adalah *doubling time*. Hasil *doubling time* menunjukkan pada konsentrasi sampel tertinggi yaitu 500 µg/mL sebesar 104,516 jam dan kontrol sel sebesar 2936,11 jam. Pengamatan pada apoptosis sel dengan metode *double staining* dilakukan dengan pengecatan sel menggunakan akridin oranye-etidium bromide. Hasil pengamatan menunjukkan pada sel yang mendapat perlakuan dengan ekstrak etanol rimpang lengkuas memiliki warna yang seragam dan morfologi sel tidak jauh berbeda dengan kontrol sel. Sehingga diketahui pada penelitian ini ekstrak etanol rimpang lengkuas tidak dapat menghambat pertumbuhan sel dan tidak dapat memacu proses apoptosis sel.

Kata Kunci: rimpang lengkuas, MCF-7, antiproliferatif, apoptosis.

Abstract

Alpinia galanga reported contain flavonoid compound that have potential to anticancer activity. This study aims to examined the anticancer activity of *Alpinia galanga* ethanol extract by inhibiting the growth of cancer cells, suppressing cancer cell proliferation, and apoptotic induction. Ethanolic extract was prepared from extraction of galanga rhizome using maceration method with ethanol 96% as a solvent. Cytotoxic test was examined with MTT assay method and 5 concentrations ranging from 500; 250; 125; 62,5; and 31,25 µg/mL. The result of cytotoxic test showed that IC₅₀ of the extract is 706,75 µg/mL. The experiment of cancer cell growth induction also observed by proliferation kinetics of cancer cell with different time incubation cells for 24, 48, and 72 hours. Doubling time method was used in antiproliferation test. The doubling time result of *Alpinia galanga* ethanol extract in higher concentration 500 µg/mL is 104,516 hours and cell control is 2936,11 hours. Apoptotic observation was performed by double staining method, colouring cell with color reagent acridin orange-etidium bromide. From the double staining test, we identified cell that were treated with *Alpinia galanga* ethanol extract showed the same morphology to cell control. So, the result from this experiment is *Alpinia galanga* ethanol extract can not inhibiting the growth of cancer cells and induction apoptotic.

Keywords: galanga rhizome, MCF-7, antiproliferation, apoptotic.

PENDAHULUAN

Kanker merupakan suatu pertumbuhan yang tidak beraturan dari suatu sel. Kanker payudara merupakan jenis kanker yang umum terjadi dan menjadi penyebab utama kematian pada wanita di dunia. Berdasarkan National Cancer Institute, angka kasus kanker payudara pada wanita terus bertambah setiap tahunnya. Kanker payudara menjadi kasus kanker yang paling banyak terjadi di Indonesia dengan prevalensi sebesar 18,6%. Diperkirakan sekitar 12/100.000 wanita di Indonesia mengalami kanker payudara (Kemenkes RI, 2019).

Telah dikembangkan beberapa terapi untuk kanker payudara, seperti kemoterapi, radiasi, dan operasi (Ghil, 2013). Pasien dengan kanker payudara perlu mempertimbangkan potensi dari terapi yang dipilih, risiko kekambuhan penyakit, serta risiko pasca terapi. Pengobatan dengan kemoterapi yang sering digunakan pada pasien kanker memberikan beberapa risiko, seperti mual, muntah, dan rambut rontok (Partridge *et al.*, 2001). Selain itu, agen kemoterapi dengan struktur dan mekanisme antitumor yang berbeda dinilai gagal menjadi terapi yang efektif karena adanya resistensi obat. Obat dari tumbuhan dinilai memiliki efek samping yang lebih rendah dibanding dengan obat konvensional. Sehingga obat-obat dari bahan alam dipilih menjadi alternatif pengganti obat yang berasal dari sintesis bahan kimia (Chouni and Paul, 2018). Bahan alam memiliki peran signifikan dalam penemuan dan pengembangan terapi penyakit pada manusia salah satunya antikanker. Hal ini dibuktikan dengan berdasarkan analisis oleh United States Food and Drug Administration (FDA) sekitar 60% obat antikanker berasal dari alam (Newman *et al.*, 2003).

Beberapa agen terapeutik telah diketahui dapat menghentikan proliferasi sel kanker dengan menginduksi apoptosis. Apoptosis merupakan mekanisme sel yang dibuat untuk mengalami kematian untuk mempertahankan jaringan homeostatis dengan mengeliminasi sel yang tidak diinginkan (Sharma *et al.*, 2019). Sebagian sel normal dapat mati karena adanya apoptosis tetapi beberapa sel tumor mengalami kegagalan seperti bertambahnya massa tumor dan resistensi kemoterapi. Kemoterapi memiliki aktivitas utama menginduksi apoptosis, sehingga kegagalan pada jalur apoptosis dapat membuat kemoterapi menjadi kurang efisien. Kegagalan pengobatan kemoterapi konvensional membuat pendekatan baru dengan bahan alam sangat dibutuhkan (Samarghandian *et al.*, 2014).

Lengkuas (*Alpinia galanga* L.) merupakan tumbuhan rimpang yang berasal dari Asia Tenggara. Lengkuas banyak digunakan sebagai obat tradisional karena memiliki beberapa aktivitas farmakologi, diantaranya sebagai antibakteri, antijamur, antivirus, antidiabetik, dan antiplatelet. Selain itu, lengkuas juga kaya akan kandungan senyawa fenolik dan flavonoid yang merupakan senyawa antioksidan. Adanya komponen senyawa antioksidan dalam jumlah banyak dapat memberikan efek karsinogenik pada sel kanker. Studi menyebutkan komponen aktif ekstrak lengkuas seperti 1'S'1'-acetoxychavicol acetate dan 1'-acetoxychavicol acetate memiliki aktivitas antitumor (Chouni and Paul, 2018). Penelitian sebelumnya menemukan ekstrak lengkuas (*Alpinia galanga* L.) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara dengan nilai IC₅₀ sebesar 64 µg/mL (El-Hadidy *et al.*, 2020).

METODE

Alat

Neraca analitik, vakum, corong buncher, rotary evaporator, waterbath, cytotoxic safety cabinet, mikroskop, hemocytometer, ELISA reader, inkubator, vortex, 96 well-plate, 24 well-

plate, coverslips 14 mm, mikroskop fluoresence, mikropipet, tube, eppendorf, pinset, cawan porselin.

Bahan

Serbuk rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* L.), alkohol 96%, sel MCF-7, RPMI, larutan SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), larutan PBS (Phosphate Bovine Serum), larutan MTT, larutan DMSO, larutan RPMI, tripsin-EDTA, reagen akridin oranye-etidium bromide, tip, kertas saring, alumunium foil, alkohol 70%.

Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Serbuk rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* L.) yang telah dihaluskan ditimbang sebanyak 150 gram. Kemudian serbuk dimasukkan kedalam toples kaca dan dilarutkan dengan etanol 96% sebanyak 1,5 L. Rendaman dibiarkan selama 5 hari ditutup dengan kain dan disimpan ditempat terhindar dari sinar matahari. Rendaman sesekali diaduk kemudian setelah 5 hari rendaman disaring menggunakan vakum. Filtrat hasil yang diperoleh kemudian diuapkan menggunakan rotary evaporator. Hasil evaporator diuapkan kembali menggunakan waterbath untuk memperoleh ekstrak kental.

Kultur Sel MCF-7

Sel dipanen dengan mencuci sel menggunakan PBS 5 mL. Tripsin ditambahkan sebanyak 500 μ L dan diinkubasi 4 menit. Setelah itu ditambahkan media RPMI 5 mL. Sel diresuspensikan dengan mikropipet untuk mencegah sel bergerombol kemudian sel diamati di mikroskop. Dipindahkan sel kedalam tabun kronikel. Lalu dihitung jumlah sel yang dibutuhkan untuk uji sitotoksik dengan mengambil 10 μ L sel diteteskan ke alat hemocytometer. Sel dilihat dengan mikroskop dan dihitung seluruh jumlah sel secara cepat menggunakan counter. Jumlah sel yang dibutuhkan dihitung menggunakan rumus (CCRC, 2010) :

$$\text{Jumlah sel yang diperoleh } (/mL) = \frac{\text{Jumlah sel kamar } (A+B+C+D) \times 100000}{4} \quad (1)$$

$$\text{Jumlah sel yang ditransfer } (mL) = \frac{\text{Jumlah sel yang diperlukan}}{\text{jumlah sel yang diperoleh } (/mL)} \quad (2)$$

Pembuatan Larutan Uji

Larutan stok dibuat dengan menimbang ekstrak kental lengkuas 10 mg dimasukkan kedalam eppendorf. Ditambahkan pelarut DMSO 100 μ L kemudian di vortex. Setelah ekstrak larut ditambahkan dengan media DMEM ad 1 mL kemudian di vortex kembali. Larutan sampel ekstrak lengkuas (*Alpinia galanga* L.) dibuat dengan 5 seri konsentrasi 500; 250; 125; 62,5; dan 31,25 μ g/mL. Pada uji ini digunakan kontrol positif Doxorubicin 2 mg/mL. Kontrol positif dibuat dengan 5 seri konsentrasi 100; 50; 25; 12,5; dan 6,25 μ g/mL.

Uji Sitotoksik

Media sel dalam 96 well-plate yang telah diinkubasi dibuang terlebih dahulu dengan membalikkan 96 well-plate diatas nampan tempat buangan. Kemudian larutan sampel dan kontrol positif dimasukkan kedalam sumuran sebanyak 100 μ L dari konsentrasi rendah ke tinggi menggunakan mikropipet. Kontrol pelarut dimasukkan kedalam sumuran sebanyak 100 μ L mengandung 5 μ L DMSO dan 995 μ L media DMEM. Kontrol media diberi media DMEM 100 μ L

dan kontrol sel dibiarkan kosong. Diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator dengan suhu 37°C. Setelah 24 jam, sel diamati terlebih dahulu dengan mikroskop.

Larutan MTT sebanyak 100 µL dimasukkan kedalam tiap sumuran kemudian diinkubasi kembali selama 2 – 4 jam. Setelah diinkubasi dikeluarkan dan diamati terbentuknya kristal formazandengan mikroskop. Tiap sumuran ditambahkan 100 µL larutan SDS 10% dalam 0,01 N HCl. Penambahan larutan SDS ini tidak perlu dilakukan di dalam LAF. Kemudian *plate* dibungkus denganaluminium foil dan disimpan ditempat gelap dengan suhu ruang selama 24 jam. Sel dibaca absorbansinya menggunakan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 595 nm. Absorbansi yang diperoleh dihitung persentase sel hidup dengan rumus (CCRC, 2013) :

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{\text{absorbansi sampel} - \text{absorbansi kontrol media}}{\text{absorbansi kontrol pelarut} - \text{absorbansi kontrol media}} \times 100\% \quad (3)$$

Dicari nilai IC₅₀ dengan nilai x pada regresi linier grafik log konsentrasi vs persentase sel hidup.

Uji Antiproliferatif

Uji antiproliferatif dimulai dengan panen sel dan pembuatan seri konsentrasi larutan sampel. Larutan sampel dibuat pada konsentrasi sebesar dibawah nilai IC₅₀. Sel diinkubasi pada suhu 37°C dengan rentang waktu yang berbeda (24, 48, dan 72 jam). Ditambahkan larutan MTT 100µL kedalam tiap sumuran. Sel diinkubasi kembali 2 – 4 jam. Setelah kristal formazan terbentuk, ditambahkan 100 µL larutan SDS 10% dalam 0,01 N HCl. Dibungkus plate dengan aluminium foil dan disimpan dalam suhu ruang selama 24 jam. Kemudian dibaca absorbansinya menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 595 nm. Hasil absorbansi dihitung persentase sel hidup dan dibuat grafik log konsentrasi vs persentase sel hidup. Kemudian diperoleh regresi linier untuk menghitung nilai IC₅₀.

Uji Apoptosis

Uji apoptosis dilakukan dengan menggunakan 24 well-plate. Coverslip dimasukkan kedalam sumuran sesuai dengan peta uji. Kemudian sel dipanen dan dimasukkan kedalam sumuran. Selyang sudah dipanen kemudian dibuang dan diberi perlakuan dengan larutan sampel dengan konsentrasi dibawah IC₅₀. Sel diinkubasi selama 24 jam kemudian dilihat di mikroskop. Isi plate dibuang dan ditiriskan lalu ditambahkan larutan MTT sebanyak 200 µL tiap sumuran. Kristal formazan diamati dengan mikroskop. Diambil coverslip menggunakan pinset kemudian ditambahkan dengan reagen akridin oranye-etidium bromide sebagai pewarna. Diamati sel menggunakan mikroskop fluorescence.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi

Rimpang lengkuas yang sudah dikeringkan dihaluskan dengan tujuan untuk memperbesar interaksi antara sampel dengan pelarut sehingga memudahkan zat-zat yang terkandung dalam sampel terbawa dalam pelarut. Ekstraksi pada penelitian ini menggunakan metode maserasi. Maserasi merupakan metode ekstraksi yang dilakukan dengan merendam sampel pada pelarut tertentu dalam jangka waktu yang ditetapkan.

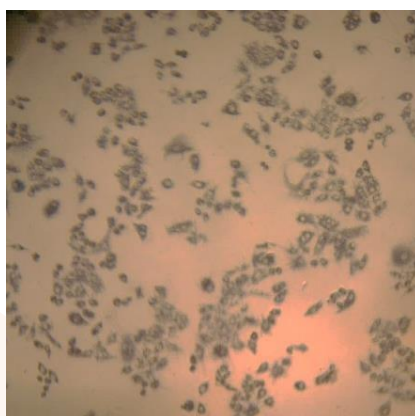
Metode ekstraksi ini memiliki kelebihan relatif mudah, murah, dan mengurangi adanya penguapan senyawa penting yang ada dalam ekstrak. Namun metode maserasi juga memiliki

kekurangan, seperti membutuhkan waktu yang lama (Kiswandono, 2011). Pelarut yang digunakan pada ekstraksi lengkuas adalah etanol 96%. Pembuatan ekstrak simplisia serbuk kering dengan metode maserasi jumlah pelarut yang dimasukkan kedalam maserator adalah 10 bagian pelarut sehingga perbandingan sampel dengan pelarut adalah 1:10 (Depkes RI, 2009). Hasil ekstrak kental lengkuas diperoleh 4,8 gram dengan rendemen sebesar 3,2%.

Sitotoksik

Uji sitotoksik ekstrak etanol rimpang lengkuas terhadap sel MCF-7 dilakukan dengan metode MTT assay. Metode MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) digunakan untuk mengukur efek obat terhadap pertumbuhan sel pada konsentrasi yang berbeda. Prinsip metode MTT adalah pembentukan kristal formazan berwarna ungu karena adanya reaksi reduksi garam tetrazolium kuning yang larut dalam air. Reagen MTT bereaksi dengan sel hidup yang kemudian dipecah melalui reaksi pewarna tetrazolium kuning larut dalam air yang akan direduksi oleh sel hidup dan berubah menjadi kristal formazan berwarna ungu (Plumb, 2004). Perubahan warna sel menjadi ungu setelah diberi reagen MTT dapat dilihat pada (Gambar 1). Hasil uji sitotoksik dinilai dari sensitivitas obat yang ditentukan dengan konsentrasi obat yang diperlukan untuk mencapai penghambatan pertumbuhan sebesar 50% atau yang sering disebut dengan IC₅₀ (Meerlo *et al.*, 2011).

Hasil absorbansi sel menggunakan ELISA *reader* digunakan untuk menentukan presentase sel hidup. Diperoleh hasil semakin tinggi kadar konsentrasi ekstrak semakin rendah presentase sel hidup. Hal ini menunjukkan adanya kematian sel karena pengaruh ekstrak. Menurut penelitian sebelumnya terhadap ekstrak etanol lengkuas memiliki aktivitas antikanker terhadap sel MCF-7 dengan nilai IC₅₀ sebesar 64 µg/mL (El-Hadidy *et al.*, 2020). Dalam penelitian ini, diperoleh nilai IC₅₀ ekstrak etanol lengkuas sebesar 706,75 µg/mL. Hasil menunjukkan ekstrak etanol lengkuas tidak aktif menginduksi kematian sel MCF-7.



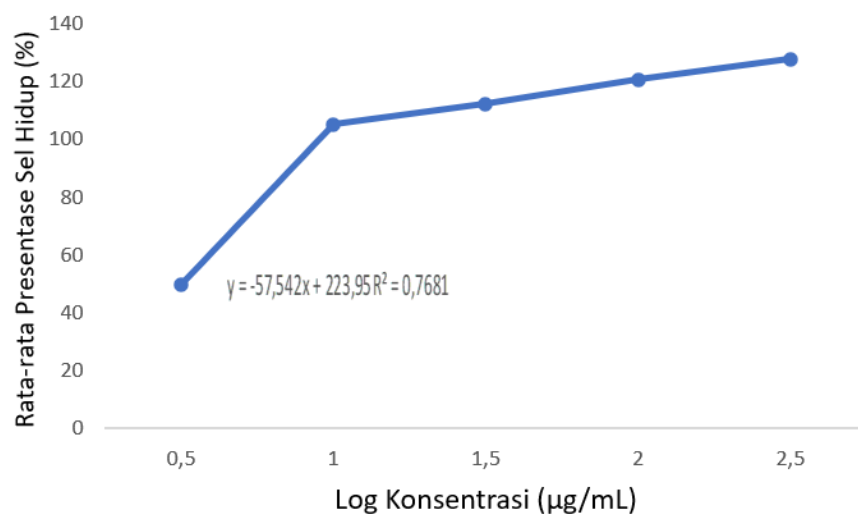
Gambar 1. Morfologi sel setelah terbentuk kristal formazan

Doxorubicin sebagai kontrol positif menunjukkan nilai absorbansi sel (Tabel 2) semakin kecil pada konsentrasi larutan uji yang semakin besar. Hasil persentase sel hidup semakin tinggi tiap konsentrasi larutan uji semakin rendah persentase sel hidup. Dari hasil regresi linier (Gambar 3) diperoleh hasil IC₅₀ Doxorubicin diperoleh sebesar 1,7135 µg/mL. Hasil tersebut

menunjukkan Doxorubicin mampu menghambat pertumbuhan sel MCF-7 dengan baik. Doxorubicin merupakan agen kemoterapi yang telah diuji secara klinis memiliki aktivitas antikanker.

Tabel 1. Pengaruh perlakuan dengan ekstrak etanol rimpang lengkuas terhadap sel MCF-7

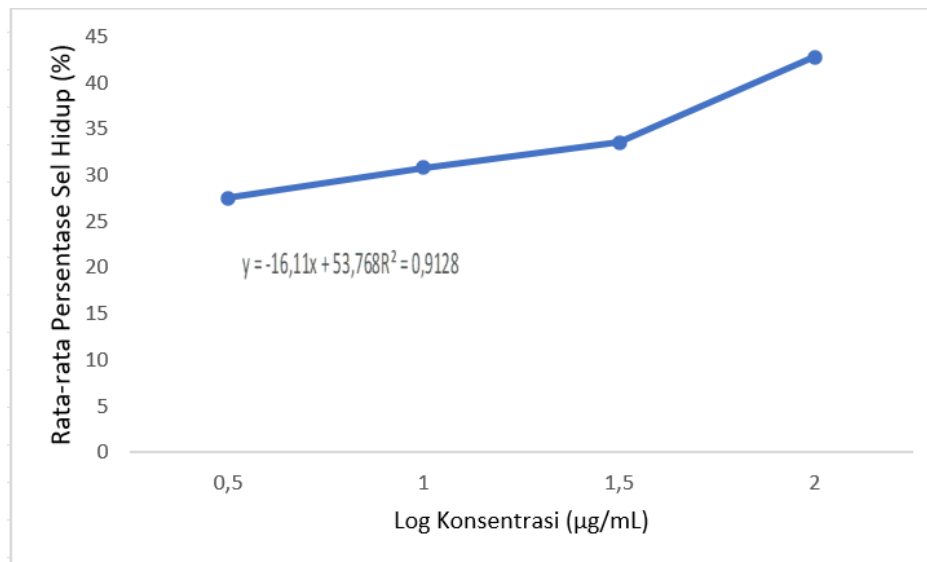
Konsentrasi	Log Konsentrasi	Absorbansi			% Sel Hidup			Rata-rata
		R1	R2	R3	R1	R2	R3	
500	2,69897	0,305	0,286	0,306	51,7789	45,7433	52,0966	49,8729
250	2,39794	0,475	0,472	0,473	105,781	104,828	105,146	105,252
125	2,09691	0,494	0,506	0,485	111,817	115,629	108,958	112,135
62,5	1,79588	0,538	0,518	0,509	125,794	119,441	116,582	120,606
32,25	1,50853	0,54	0,528	0,565	126,429	122,618	134,371	127,806



Gambar 2. Pengaruh perlakuan dengan ekstrak etanol rimpang lengkuas terhadap sel MCF-7

Tabel 2. Pengaruh perlakuan dengan Doxorubicin terhadap sel MCF-7

Konsentrasi (µg/mL)	Log Konsentrasi	Absorbansi			% Sel Hidup			Rata-rata
		R1	R2	R3	R1	R2	R3	
50	1,69897	0,23	0,231	0,225	27,954	28,271	26,365	27,530
25	1,39794	0,242	0,235	0,24	31,766	29,542	31,130	30,813
12,5	1,09691	0,248	0,247	0,248	33,672	33,354	33,672	33,566
6,25	0,79588	0,3	0,29	0,24	50,190	47,014	31,130	42,778



Gambar 3. Pengaruh perlakuan dengan Doxorubicin terhadap sel MCF-7

Perbedaan hasil penelitian ini dengan penelitian sebelumnya dimungkinkan karena sumber bahan yang digunakan berbeda. Diperlukan penelitian lebih lanjut dengan analisis fitokimia penentuan identitas tumbuhan pada sumber bahan yang digunakan. Analisis fitokimia pada tumbuhan perlu dilakukan untuk mengetahui sumber tumbuhan baru yang digunakan memiliki kandungan senyawa yang sudah dikenal (Endarini, 2016). Efek karsinogenik ekstrak etanol rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* L.) telah diketahui berasal dari senyawa flavonoid. Senyawa flavonoid memiliki aktivitas antikanker dengan mekanisme mengubah aktivitas enzim *reactive agent species* (ROS), berpartisipasi dalam menangkap siklus sel, menginduksi apoptosis, dan dapat menekan proliferasi sel kanker (Kopustinskiene *et al.*, 2020).

Antiproliferatif

Uji antiproliferatif dilakukan untuk mengetahui pengaruh lama waktu inkubasi terhadap kecepatan pertumbuhan sel karena adanya pengaruh ekstrak etanol rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* L.). Konsentrasi ekstrak yang digunakan pada uji ini sama dengan konsentrasi pada uji sitotoksik karena pada uji sitotoksik sebelumnya diketahui ekstrak etanol lengkuas tidak aktif menginduksi kematian sel. Pada uji antiproliferatif konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah konsentrasi yang lebih rendah dari nilai IC50. Penggunaan konsentrasi dibawah nilai IC50 ini untuk menghindari terjadinya kematian sel yang terlalu banyak sehingga tidak dapat mengamati proliferasi sel. Metode yang digunakan sama dengan uji sitotoksik yaitu metode MTT, perbedaannya terdapat pada waktu inkubasi sel setelah diberi perlakuan dengan ekstrak.

Efek antiproliferatif ekstrak terhadap sel diamati dengan membandingkan lama waktu yang dibutuhkan sel pada masing-masing konsentrasi dengan kontrol sel untuk dapat menggandakan diri menjadi dua kali lipat. Parameter uji antiproliferatif dilihat dari perhitungan *doubling time* sampel dan kontrol sel. Perhitungan *doubling time* diperoleh dari nilai x hasil regresi linier persamaan waktu inkubasi vs jumlah sel hidup dengan nilai Y adalah log 2 kali jumlah sel awal (Dona *et al.*, 2016). Ekstrak tumbuhan yang memiliki efek antiproliferatif akan memiliki nilai *doubling time* lebih besar daripada kontrol sel. Efek antiproliferatif pada ekstrak

dapat diketahui apabila semakin tinggi kadar konsentrasi ekstrak maka semakin panjang nilai *doubling time*. Apabila *doubling time* semakin panjang menunjukkan kemampuan ekstrak dapat memperpanjang penundaan pertumbuhan sel (Nurani, 2012).

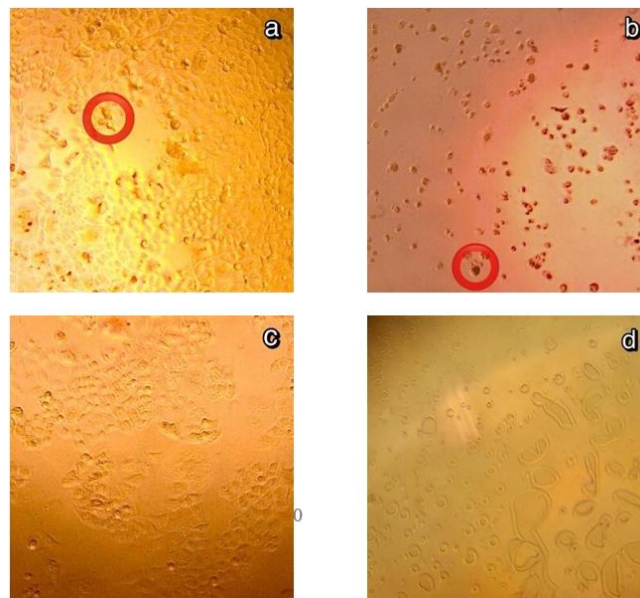
Tabel 3. Persentase sel hidup pada perlakuan waktu inkubasi yang berbeda

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Jumlah Sel Hidup			Persamaan Waktu Inkubasi (Jam) vs Jumlah Sel Hidup	<i>Doubling Time</i>
	Jam ke-24	Jam ke-48	Jam ke-72		
500	63.339	15.126	10.347	$y = -0,0164x + 5,1189$	105
250	133.670	78.577	64.556	$y = -0,0066x + 5,2599$	281
125	142.411	115.803	102.241	$y = -0,003x + 5,2195$	605
62,5	153.169	152.930	122.432	$y = -0,002x + 5,2498$	922
31,25	162.314	169.432	138.425	$y = -0,0014x + 5,2627$	1.327
Kontrol sel	139.910	142.028	130.976	$y = -0,0006x + 5,1671$	2.937

Hasil uji antiproliferatif ekstrak etanol rimpang lengkuas (Tabel 3) menunjukkan semakin lama waktu inkubasi semakin menurun jumlah sel hidup. Dapat dilihat pula dari hasil *doubling time* semakin besar kadar konsentrasi ekstrak etanol rimpang lengkuas semakin kecil nilai *doubling time*. Nilai *doubling time* ekstrak rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* L.) pada konsentrasi terbesar yaitu 500 $\mu\text{g/mL}$ diperoleh 104,516 jam dan pada konsentrasi terendah yaitu 31,25 $\mu\text{g/mL}$ diperoleh nilai *doubling time* sebesar 1.327 jam. Serta nilai *doubling time* sampel lebih kecil dibandingkan dengan nilai *doubling time* pada kontrol sel yaitu 2936,11 jam. Hasil tersebut menunjukkan sel MCF-7 masih dapat mengalami pertumbuhan dan ekstrak etanol rimpang lengkuas pada penelitian ini tidak memiliki efek dalam menghambat pertumbuhan sel MCF-7.

Apoptosis

Induksi apoptosis sel diamati dengan tujuan mengetahui mekanisme sel akibat adanya perlakuan dari ekstrak etanol rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* L.). Metode yang digunakan pada uji ini adalah metode double staining dengan pengecatan sel menggunakan campuran reagen warna etidium bromide-akridin oranye (AO-EtBr). Prinsip dari pengecatan sel ini didasarkan pada perubahan warna hijau pada sel hidup dan warna oranye pada sel yang mengalami kematian (Arsenijevic *et al.*, 2006). Uji apoptosis dilakukan pada kadar konsentrasi sampel nilai IC50, namun pada penelitian ini tidak didapatkan nilai IC50 sehingga kadar konsentrasi sampel yang digunakan adalah 500 $\mu\text{g/mL}$.



Gambar 4. Hasil Pengamatan Apoptosis Sel MCF-7 (a) Ekstrak etanol rimpang lengkuas 500 µg/mL, (b) Doxorubicin 50 µg/mL, (c) Kontrol sel, (d) Kontrol pelarut DMSO 0,1%

Hasil uji apoptosis (Gambar 4) menunjukkan hasil pengecatan warna yang tidak maksimal ketika dilihat pada mikroskop fluorescence. Hal ini dikarenakan kondisi reagen pewarna akridin oranye-etidium bromide (AO-EtBr) yang sudah lama sehingga menyebabkan warna sel tidak terlihat. Pada sel yang mendapat perlakuan dengan ekstrak etanol rimpang lengkuas 500 µg/mL menunjukkan hasil yang tidak jauh berbeda dengan kontrol sel. Dapat diamati dari hasil uji apoptosis dengan perlakuan ekstrak etanol rimpang lengkuas banyak sel dengan warna seragam dan terlihat tidak mengalami kerusakan. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol rimpang lengkuas dalam penelitian ini tidak memiliki aktivitas anti-sitotoksik dan tidak dapat menginduksi kematian sel secara terprogram atau apoptosis.

Perlakuan sel dengan Doxorubicin 50 µg/mL menunjukkan hampir keseluruhan sel mengalami kematian ditunjukkan dengan adanya warna sel yang berbeda. Doxorubicin sebagai obat antikanker dapat menghambat proliferasi sel dan meningkatkan aktivitas apoptosis. Suatu sel dapat berfluoresensi menjadi oranye karena adanya kerusakan pada membran sel yang menyebabkan pewarna etidium bromide dapat masuk ke dalam sel (Fitria *et al.*, 2011). Pada kontrol pelarut sel diberi perlakuan dengan pelarut DMSO 0,1% tidak menunjukkan adanya fluoresensi hijau sehingga tidak memiliki aktivitas apoptosis dan menunjukkan tidak adanya kontaminasi terhadap pelarut yang digunakan.

KESIMPULAN

Ekstrak etanol rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* L.) tidak memiliki aktivitas antikanker. Berdasarkan penelitian sebelumnya ekstrak etanol rimpang lengkuas memiliki aktivitas antikanker karena mengandung senyawa flavonoid yang berperan dalam menginduksi apoptosis dan menekan proliferasi sel kanker. Perbedaan hasil penelitian ini dengan penelitian

sebelumnya dikarenakan sumber bahan yang berbeda sehingga perlu dilakukan uji senyawa fitokimia untuk mengetahui sumber tumbuhan baru yang digunakan memiliki kandungan senyawa yang sudah dikena

DAFTAR PUSTAKA

- Arsenijevic N., Ristić P. and Baskić D., 2006, Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: Fluorescence microscopy using annexin V / propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide, *Cell Biology International*, 30, 924–932.
- CCRC, 2010, Perhitungan Sel, Dalam *Cancer Chemoprevention Research Center Fakultas Farmasi UGM*, Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta, pp. 1–4.
- CCRC, 2013, Prosedur Tetap Uji Sitotoksik Metode MTT, Dalam *Cancer Chemoprevention Research Center Fakultas Farmasi UGM*, Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta, pp. 1–8.
- Chouni A. and Paul S., 2018, A Review on Phytochemical and Pharmacological Potential of *Alpinia galanga* A Review on Phytochemical and Pharmacological Potential of *Alpinia galanga*, *Pharmacognosy Journal*, 10 (1), 9–15.
- Depkes RI, 2009, Farmakope Herbal Indonesia Edisi Pertama, Dalam *Farmakope Herbal Indonesia*, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, pp. 176–177.
- Dona R., Sulistyani N. and Nurani L.H., 2016, Uji sitotoksitas dan antiproliferatif ekstrak etanol daun leunca (*Solanum nigrum* L) terhadap sel raji, *Pharmaciana*, 6 (2), 181–190.
- El-Hadidy E.M., Rashad N.G. and Ali M.Y., 2020, Theoretical Study, Antioxidant Activity and Anti-cancer Studies of Galangal (*Alpinia galanga* L.), *Academic Journal of Current Research*, 7 (8), 101–145.
- Endarini L.H., 2016, *Farmakognosi dan Fitokimia*, Pusdik SDM Kesehatan, Jakarta.
- Fitria M., Armandari I., Septhea D.B., Ikawati A.H.M. and Meiyanto E., 2011, Ekstrak Etanolik Herba Ciplukan (*Physalis angulata* L.) Berefek Sitotoksik dan Menginduksi Apoptosis pada Sel Kanker Payudara MCF-7, *Bionatura - Jurnal Ilmu-ilmu Hayati dan Fisik*, 13 (2), 101–107.
- Ghil S., 2013, *Antiproliferative activity of Alpinia officinarum extract in the human breast cancer cell line MCF-7*, Korea.
- Kemkes RI, 2019, *Panduan Penatalaksanaan Kanker Payudara (Breast Cancer Treatment Guideline)*, Indonesia. Terdapat di: <http://kanker.kemkes.go.id/guidelines/PPKPayudara.pdf>.
- Kiswandono A.A., 2011, Skrining Senyawa Kimia dan Pengaruh Metode Maserasi dan Refluks pada Biji Kelor (*Moringa oleifera* Lamk) terhadap Rendemen Ekstrak yang Dihasilkan, *Jurnal Sains Natural Universitas Nusa Bangsa*, 1 (2), 126–134.
- Kopustinskiene D.M., Jakstas V., Savickas A. and Bernatoniene J., 2020, Flavonoids as Anticancer Agents, *Nutrients*, 12 (2), 1–25.
- Meerlo J. Van, Kaspers G.J.L. and Cloos J., 2011, Cell Sensitivity Assays : The MTT Assay, Dalam *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*, pp. 237–238.

-
- Newman D.J., Cragg G.M. and Snader K.M., 2003, Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002, *Journal of Natural Products*, 66 (7), 1022–1037.
- Nurani L.H., 2012, Uji Sitotoksitas dan Antiproliferatif Sel Kanker Payudara T47D dan Sel Vero Biji *Nigella sativa*, L., *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 2 (1), 17–29.
- Partridge A.H., Burstein H.J. and Winer E.P., 2001, Side effects of chemotherapy and combined chemohormonal therapy in women with early-stage breast cancer., *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, (30), 135–142.
- Plumb J.A., 2004, Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay, Dalam *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*, Humana Press, New Jersey, pp. 165–166.
- Samarghandian S., Hadjzadeh M., Afshari J.T. and Hosseini M., 2014, Antiproliferative activity and induction of apoptotic by ethanolic extract of *Alpinia galanga* rhizome in human breast carcinoma cell line, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14 (192), 1–9.
- Sharma A., Boise L.H. and Shanmugam M., 2019, Cancer metabolism and the evasion of apoptotic cell death, *Cancers*, 11 (1114), 1–20.