

AKTIVITAS SITOTOKSIK DAN PENGHAMBATAN MIGRASI SEL KANKER 4T1 DARI EKSTRAK DAUN WARU (*Hibiscus tiliaceus* Linn.)

Cytotoxic Activity and Migration Inhibition of 4T1 Cancer Cell from Waru Leaves Extract (Hibiscus tiliaceus Linn.)

Devi Nisa Hidayati*), Erika Indah Safitri, Dwi Lutvi Alviani, Masita Nur Amalia Putri
Fakultas Farmasi, Universitas Wahid Hasyim, Semarang, Jawa Tengah, Indonesia
*e-mail: devinisahidayati@unwahas.ac.id

ABSTRACT

Breast cancer is one of cancer type with the highest prevalence in Indonesia. The failure of cancer therapy due to cellular resistance has encouraged research interest in anticancer medications, mainly those from natural substances. Several studies have shown cytotoxic effects of sea hibiscus (Hibiscus tiliaceus Linn.). This study aimed to determine the cytotoxic activity and cell migration inhibition by sea hibiscus leaves extract against 4T1 breast cancer cells. Sea hibiscus leaves extract was obtained by maceration method. The extract cytotoxicity test was performed by MTT assay. Cell migration inhibition test was carried out using the scratch wound healing assay. The results showed the IC₅₀ value in 4T1 cells was 892.4 µg/mL. The extract at 892, 446 and 223 µg/mL was able to inhibit 4T1 breast cancer cell migration based on the percentage of cell closure at 18, 24, and 42 hours. Thus, sea hibiscus leaf extract has the potential to be further developed as an antimigration agent in 4T1 breast cancer cells.

Keywords: *Hibiscus tiliaceus* Linn., breast cancer, cytotoxicity, migration, 4T1 cells

ABSTRAK

Kanker payudara merupakan jenis penyakit kanker dengan prevalensi tertinggi di Indonesia. Kegagalan dalam terapi kanker akibat resistensi sel telah mendorong upaya pengembangan obat anti kanker, terutama dari bahan alam. Beberapa penelitian menunjukkan daun waru memiliki aktivitas sitotoksik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik dan penghambatan migrasi sel oleh ekstrak daun waru terhadap sel kanker payudara 4T1. Ekstrak daun waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn.) diperoleh dengan metode maserasi. Uji sitotoksitas ekstrak daun waru dilakukan dengan MTT assay. Uji penghambatan migrasi sel dilakukan dengan metode *scratch wound healing*. Hasil penelitian menunjukkan nilai IC₅₀ pada sel 4T1 sebesar 892,4 µg/mL. Ekstrak daun waru konsentrasi 892 µg/mL, 446 dan 223 µg/mL mampu menghambat migrasi sel kanker payudara 4T1 berdasarkan persentase penutupan sel pada jam ke 18, 24 dan 42. Dengan demikian, ekstrak daun waru berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai agen antimigrasi pada sel kanker payudara 4T1.

Kata kunci: *Hibiscus tiliaceus* Linn., kanker payudara, sitotoksik, migrasi, sel 4T1

PENDAHULUAN

Data *Global Cancer Observatory* 2020 menunjukkan kasus kanker yang paling banyak terjadi di Indonesia adalah kanker payudara, yakni 65.858 kasus atau 31% dari total 213.546 kasus kanker pada wanita. Tingkat mortalitas yang disebabkan kanker payudara menempati peringkat kedua dari semua kasus kanker (Globocan, 2021). Kemenkes RI (2019) menyebutkan angka

Received : 14-12-2021
Revised : 14-03-2022
Accepted : 11-04-2022
Publish : 01-07-2022

kejadian kanker payudara 42,1 per 100.000 penduduk dengan rata-rata kematian 17 per 100.000 penduduk.

Masalah utama kanker payudara yaitu kemampuan sel kanker bermetastasis atau bergerak dari masa tumor primernya dan membentuk koloni baru di bagian organ yang lain. Hal tersebut menjadi penyebab utama tingginya tingkat kematian akibat kanker payudara (Geiger & Peeper, 2009). Kemoterapi dan terapi radiasi merupakan pilihan utama untuk mengatasi kanker payudara. Kedua pilihan terapi tersebut menimbulkan efek samping yang tidak bisa dihindari, diantaranya rambut rontok, mual, muntah, anemia, rasa kelelahan hingga efek psikososial (Anjum *et al.*, 2017; Williams *et al.*, 2018). Bahan alam menjadi salah satu sumber dalam upaya pengembangan obat anti kanker. Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai anti kanker adalah daun waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn.)

Di Indonesia, daun waru digunakan sebagai obat tradisional antara lain mengatasi radang, bisul, amandel, peluruh dahak, peluruh kencing, serta penurun demam (Dalimartha, 2006; Depkes RI, 2001). Ekstrak daun waru memiliki efek sitotoksik pada sel kanker payudara jenis MCF-7 (Andriani *et al.*, 2020). Kandungan metabolit sekunder ekstrak daun waru yaitu polifenol, flavonoid, terpenoid, steroid dan glikosida (Samsudin *et al.*, 2019). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik dan penghambatan migrasi dari ekstrak daun waru terhadap sel kanker 4T1. Sel 4T1 merupakan sel kanker yang diisolasi dari kelenjar mammae mencit (*Mus musculus*) dari galur BALB/cfC3H dengan karakteristik yang mirip dengan kanker payudara stadium lanjut/metastasis (Eung *et al.*, 2015). Sel 4T1 termasuk golongan *Triple Negative Breast Cancer*/TNBC yang sering mengalami kegagalan kemoterapi (Tao *et al.*, 2008).

METODE

Alat dan Bahan

Daun waru diperoleh dari Desa Kunduran, Kecamatan Kunduran, Kabupaten Blora, Jawa Tengah. Daun waru dideterminasi di Laboratorium Ekologi dan Biosistematika Jurusan Biologi Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Diponegoro Semarang. Sel 4T1 diperoleh dari Laboratorium Kultur Sel Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Sel ditumbuhkan dalam media RPMI (Gibco) dengan penambahan penisilin-streptomisin 1% v/v (Gibco), fungizone 0,5% v/v (Gibco), dan FBS 10% v/v (Sigma).

Pembuatan Ekstrak Daun Waru

Sejumlah 9 kg daun waru dikeringkan dalam oven suhu 40 °C. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi, 1.000 gram serbuk direndam dengan 7.500 mL etanol 96% selama 3 hari, sesekali dilakukan pengadukan. Selanjutnya, sari diserkai dan ampas disaring hingga didapat maserat (filtrat I). Dilakukan remaserasi dengan menambahkan 2.500 mL etanol 96% pada ampas sehingga diperoleh filtrat II. Kedua filtrat dicampur hingga homogen dan dienaptungkan, kemudian disaring. Proses penguapan filtrat menggunakan vakum putar suhu 40 °C hingga diperoleh ekstrak kental daun waru (EDW).

Uji Sitotoksik MTT assay

Sejumlah 1×10^4 sel 4T1/sumuran ditumbuhkan dalam 96-well plate, diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO₂. Sel diberi perlakuan ekstrak daun waru konsentrasi 1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 µg/mL, selanjutnya diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO₂. Setelah inkubasi, kondisi sel diamati di bawah mikroskop. Media sel dibuang dan dicuci dengan *Phosphate Buffered Saline* (PBS) kemudian ditambahkan reagen MTT 0,5 mg/mL sebanyak 100 µL ke setiap sumuran dan inkubasi kembali 4 jam dalam inkubator CO₂. Sel diamati di bawah mikroskop, setelah formazan terlihat jelas maka ditambahkan reagen stopper 100 µL SDS dalam HCl 0,01 N.

Plate diinkubasi pada suhu kamar di tempat gelap selama semalam, serapan dibaca dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 600 nm (CCRC, 2009).

Uji Penghambatan Migrasi

Sel 4T1 ditumbuhkan pada *microplate 24 well* dengan $7,5 \times 10^4$ sel/sumuran dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C hingga mencapai 80% konfluensi. Seldicuci dengan PBS kemudian ditambahkan media kultur yang mengandung 0,5% FBS, selanjutnya diinkubasi selama 24 jam. Selanjutnya dibuat *scratch* pada permukaan dasar sumuran menggunakan ujung *yellow tip* steril. Media lama dibuang dan sel dicuci dengan PBS. Sel kemudian diberikan ekstrak daun waru konsentrasi 892, 446 dan 223 µg/mL, lalu diinkubasi, kemudian dilakukan pengamatan pada jam ke 0; 18; 24; dan 42 setelah perlakuan. Area *scratch* didokumentasikan setiap waktu pengamatan dengan perbesaran yang sama. Analisis luas area *scratch* menggunakan *software* ImageJ (CCRC, 2015).

Analisis Data

Analisis data absorbansi uji sitotoksik dilakukan dengan menghitung persentase viabilitas sel menggunakan rumus (1).

$$\text{Viabilitas sel} = \frac{\text{Absorbansi (perlakuan-kontrol media)}}{\text{Absorbansi (kontrol sel-kontrol media)}} \times 100\% \quad (1)$$

Perhitungan nilai IC₅₀ menggunakan regresi linier antar konsentrasi ekstrak dan viabilitas sel.

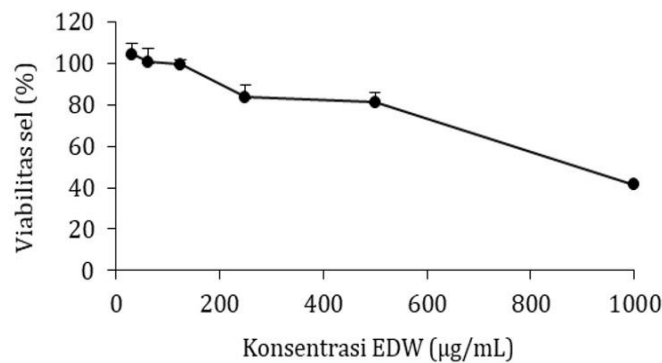
Analisis uji penghambatan migrasi menggunakan *software* Image-J. Masing-masing area penutupan sel pada tiap kelompok perlakuan dianalisis menggunakan program Microsoft Excel 2013 untuk mendapatkan data perbandingan % *closure* setiap perlakuan dengan rumus (2).

$$\% \text{ closure} = \frac{\text{Luas area (jam ke 0-jam ke n)}}{\text{Luas area jam ke 0}} \times 100\% \quad (2)$$

Hasil % *closure* jam ke 18, 24, dan 42 dianalisis dengan uji *Anova Repeated Measure*. Jika data terdistribusi normal dan homogen ($p > 0,05$) dilanjutkan uji *Post Hoc Bonferroni*. Semakin kecil persen penutupan sel (% *closure*), maka semakin baik daya hambat migrasi sel kanker (Seppatria, 2019; Zulharini *et al.*, 2017).

HASIL DAN PEMBAHASAN

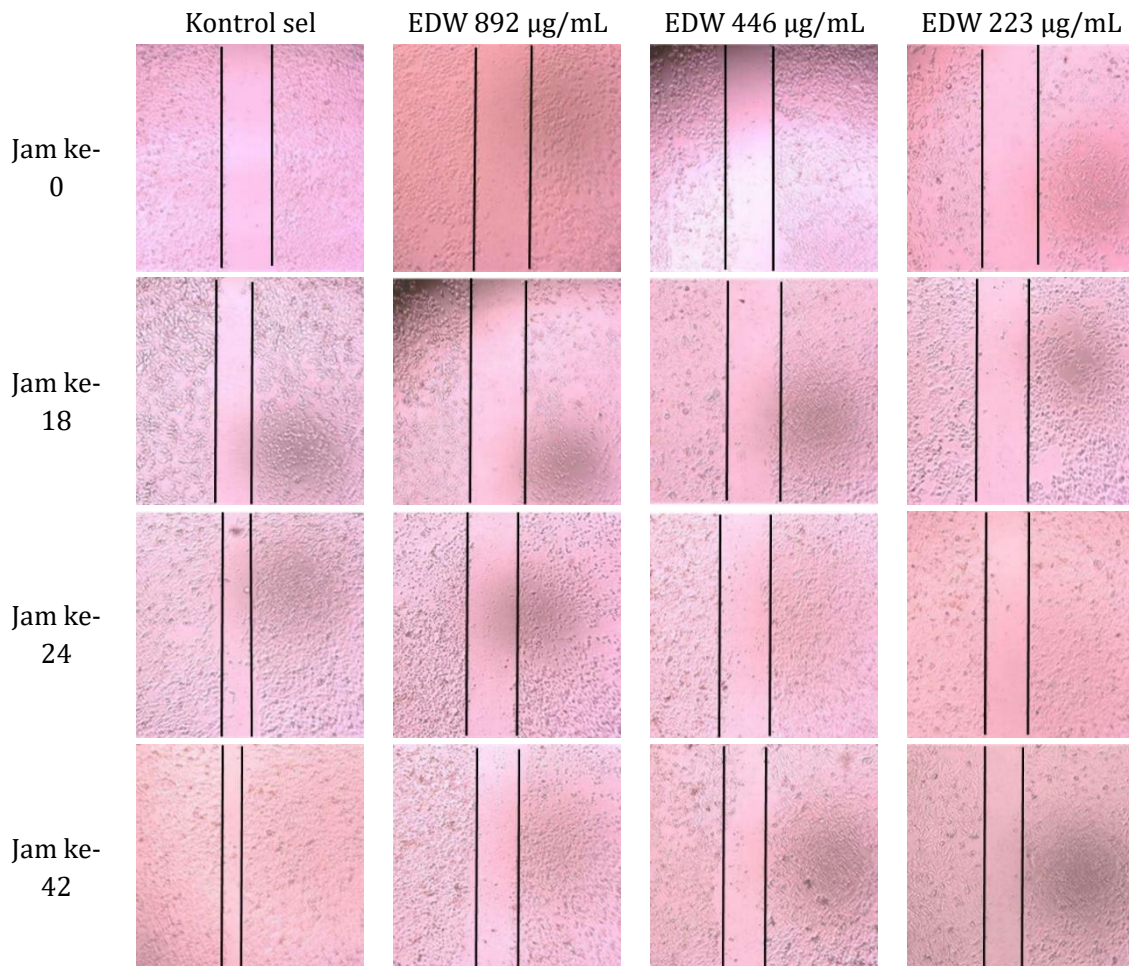
Hasil ekstraksi daun waru diperoleh rendemen 10,2%, dengan karakteristik ekstrak kental, warna kecoklatan dan berbau khas. Uji aktivitas sitotoksik EDW mengakibatkan penurunan viabilitas seiring dengan penambahan konsentrasi (Gambar 1).



Gambar 1. Efek perlakuan EDW (ekstrak daun waru) terhadap sel kanker payudara 4T1 setelah inkubasi 24 jam di bawah *inverted microscope* perbesaran 100x

Nordin *et al.*, 2018 mengategorikan efek sitotoksik ekstrak berdasarkan nilai IC_{50} yaitu sangat aktif ($IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$), moderat ($IC_{50} > 20-100 \mu\text{g/mL}$), lemah ($IC_{50} \geq 100-1000 \mu\text{g/mL}$), dan tidak aktif ($IC_{50} > 1.000 \mu\text{g/mL}$). Pada penelitian ini, nilai IC_{50} ekstrak daun waru diperoleh sebesar $892,4 \mu\text{g/mL}$, sehingga tergolong dalam kategori lemah ($IC_{50} \geq 100-1.000 \mu\text{g/mL}$). Penelitian lain menunjukkan ekstrak daun waru memiliki aktivitas sitotoksik lemah pada sel kanker payudara MDAMB-435S (Uddin *et al.*, 2009). Karakter sel 4T1 yang digunakan dalam penelitian ini termasuk golongan Triple Negative Breast Cancer/TNBC, mirip dengan sel MDAMB-435S (Tao *et al.*, 2008). Penelitian lain pada sel kanker payudara jenis MCF-7 menunjukkan efek sangat aktif dengan nilai IC_{50} $10 \mu\text{g/mL}$ (Andriani *et al.*, 2020).

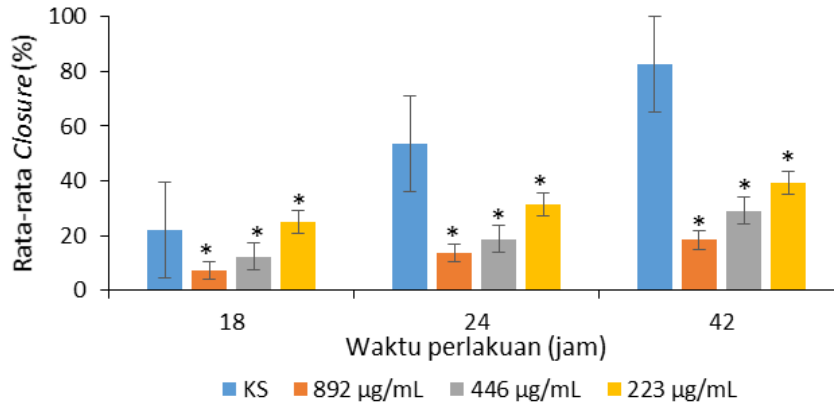
Sel kanker payudara MCF-7 dan 4T1 memiliki karakteristik yang berbeda. Sel 4T1 menunjukkan kemampuan migrasi yang lebih aktif sehingga memicu terjadinya metastasis (Tao *et al.*, 2008). Penelitian ini menguji aktivitas migrasi sel dengan metode scratch wound healing yang diamati pada jam ke-18, 24 dan 42 setelah perlakuan. Konsentrasi ekstrak daun waru yang digunakan adalah $892 \mu\text{g/mL}$ (IC_{50}), $446 \mu\text{g/mL}$ ($1/2 IC_{50}$) dan $223 \mu\text{g/mL}$ ($1/4 IC_{50}$). Penutupan scratch dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Tampilan mikroskopi aktivitas penghambatan migrasi dari EDW (ekstrak daun waru) pada tiga konsentrasi ($892 \mu\text{g/mL}$; $442 \mu\text{g/mL}$; $223 \mu\text{g/mL}$) pada jam ke-0, 18, 24 dan 42 menggunakan *inverted microscope* pada perbesaran 100x.

Pengamatan pada jam ke-18, 24 dan 42 pada kontrol sel terjadi penutupan area *scratch* yang lebih cepat dibandingkan kelompok perlakuan EDW. Luas area penutupan *scratch* ditentukan dengan

software ImageJ]. Analisis data menunjukkan perlakuan kontrol sel memiliki persen penutupan yang yang lebih besar dan berbeda signifikan dibandingkan EDW (Gambar 3).



Gambar 3. Rata-rata persentase penutupan sel kanker payudara 4T1 dengan perlakuan EDW pada jam ke 18, 24 dan 42. Pengujian dilakukan 3 kali replikasi. * $p < 0,05$ terhadap kontrol sel (KS)

Ekstrak daun waru konsentrasi 892 µg/mL memiliki aktivitas penghambatan migrasi sel terhadap sel 4T1 berbeda signifikan dibandingkan konsentrasi 223 µg/mL ($p < 0,05$). Pada perlakuan EDW konsentrasi 446 dan 892 µg/mL menunjukkan aktivitas penghambatan migrasi sel yang tidak berbeda signifikan ($p > 0,05$). Sementara itu, data persentase penutupan sel setiap waktu pengamatan jam ke-18, 24 dan 42 dari seluruh kelompok perlakuan memiliki perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$).

Kandungan senyawa aktif dalam daun waru adalah polifenol, flavonoid, terpenoid, steroid dan glikosida (Samsudin *et al.*, 2019). Penelitian lain menunjukkan daun waru mengandung katekin, rutin dan kuersetin yang merupakan golongan senyawa flavonoid (Hossain *et al.*, 2015). Berbagai penelitian menunjukkan peran flavonoid sebagai agen yang dapat menurunkan resiko terjadinya kanker maupun sebagai agen kemoterapi (Batra & Sharma, 2013). Flavonoid kuersetin terbukti memiliki efek sitotoksik terhadap sel MDA-MB231 dan 4T1 yang termasuk kategori *triple negative breast cancer* (TNBC) (Zou *et al.*, 2020). Penelitian lain menunjukkan kuersetin dapat menghambat MMP2 dan MMP-9 sehingga berpotensi dalam penghambatan migrasi sel (Goncalves, 2021; Ramos, 2007).

KESIMPULAN

Ekstrak daun waru menunjukkan potensi aktivitas sitotoksik dan penghambatan migrasi pada sel kanker payudara 4T1 dengan nilai IC_{50} 892,4 µg/mL Ekstrak daun waru berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai agen antimigrasi pada sel kanker payudara 4T1

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih penulis sampaikan kepada LP2M Universitas Wahid Hasyim yang telah memberikan hibah DIPA dalam melaksanakan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Andriani, Y., Sababathy, M., Amir, H., Sarjono, P.R., Syamsumir, D.F., Sugiwati, S., and Kassin, M.N.I. (2020). The potency of *Hibiscus tiliaceus* leaves as antioxidant and anticancer agent via induction of apoptosis against MCF-7 cells. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*, 959.
- Anjum, F., Razvi, N., & Saeed, U. (2017). Effects of Chemotherapy in Breast Cancer Patients. *National Journal of Health Sciences*, 2(2), 67–74.
- Batra, P., & Sharma, A. K. (2013). Anti-Cancer Potential of Flavonoids: Recent Trends and Future Perspectives. *PubMed Central*, 3, 439–459.
- CCRC (2015). *Pengamatan Migrasi dengan Scratch Wound Healing*. Cancer Chemoprevention Research Centre. Yogyakarta.
- Dalimartha, S. (2006). *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid II*. Trubus Agriwidya. Jakarta.
- Depkes RI. (2001). *Inventaris Tanaman Obat Indonesia: Vol. Jilid II*. Badan Penelitian dan Pengembangan Departemen RI. Jakarta.
- Eung, Y. S., Ko, Y. S., Park, S. W., Chang, K. C., & Kim, H. J (2015). P2Y2 nucleotide receptor-mediated extracellular signal-regulated kinases and protein kinase C activation induces the invasion of highly metastatic breast cancer cells. *Oncology Reports*. 34:195-202.
- Geiger, T. R., & Peeper, D. S. (2009). *Metastasis Mechanism*. Biochimica and Biophysica Acta.
- Globocan. (2021). International Agency for Research on Cancer. *WHO*, 1–2.
- Goncalves, C. F. L., Hecht, F., Cazarin, J., Fortunato, R. S., Vaisman, M., de Carvalho, D. P., & Ferreira, A. C. F. (2021). The Flavonoid Quercetin Reduce Cell Migration and Increases NIS and E-Cadherin mRNA in the Human Thyroid Cancer Cell Line BCPAP. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 529, 111266
- Haryanti, S., Murwanti, R., Putri, H., Ilmawati, G. P. N., Pramono, S., Meiyanto, E. (2017). Different 4T1 Cells Migration under *Caesalpinia sappan* L. and *Ficus septica* Burm.f Ethanol Extracts, *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 8, 21-26.
- Hossain, H., Akbar, P. N., Rahman, S. E., Yeasmin, S., Khan, T. A., Rahman, M. M., & Jahan, I. A. (2015). HPLC Profiling and Antioxidant Properties of the Ethanol Extract of *Hibiscus tiliaceus* Leaf Available in Bangladesh. *European Journal of Medicinal Plants*, 7(1), 7–15.
- Kemenkes RI. (2019). *Hari Kanker Sedunia 2019*. www.depkes.go.id. diakses tanggal 10 Oktober 2021.
- Ramos, S. (2007). Effect of Dietary Flavonoids on Apoptotic Pathways Related to Cancer Chemoprevention. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 18, 427-442.
- Samsudin, M. S., Andriani, Y., Sarjono, P. R., & Syamsumir, D. F. (2019). Study on *Hibiscus tiliaceus* Leaves as Antibacterial and Antioxidant Agents. *Jurnal Pedidikan dan Ilmu Kimia*, 3(2), 123–131.
- Seppatria, R. (2019). Pengaruh Ekstrak Etanol Kulit Terong Ungu (*Solanum melongena* L.) terhadap Penghambatan Migrasi Sel Kanker Payudara T47D Berbasis Metode *Scratch Wound Healing*. *Skripsi*. Universitas Wahid Hasyim, 28–30.
- Tao, K., Fang, M., Alroy, J., & Sahagian, G. G. (2008). Imagable 4T1 Model for the Study of Late Stage Breast Cancer. *BMC Cancer*, 8, 228.
- Uddin, S. J., Grice, I. D., & Tiralongo, E. (2009). Cytotoxic Effects of Bangladeshi Medicinal Plant Extracts. *Hindawi Publishing Corporation*, 1–7.

- Williams, P. A., Yang, D., Cao, S., & Jennelle. (2018). Breast Cancer Patients Perceive Psychosocial Side Effects of Cancer Radiation Therapy as Worse than Non-Breast Cancer Patients. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physic*, 1, 7–15.
- Zou, Y., Chen, D. Xue, G., Yu, S., Yuan, C., Huang, M., & Jiang, L. (2020). Improved Therapeutic Efficacy of Quercetin-Loaded Polymeric Nanoparticle on Triple Negative Breast Cancer by Inhibiting uPA. *RSC Advances*. 10, 34517-34526.
- Zulharini, M., Sutejo, I. R., Fadliyah, H., & Jenie, R. I. (2017). Methanolic Extract of Red Betel Leaves (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) Perform Cytotoxic Effect and Antimigration Activity toward Metastatic Breast Cancer. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 8, 94–100.