

SITOTOKSISITAS DAN INDUKSI APOPTOSIS EKSTRAK ETANOL TERIPANG *Holothuria atra* JAEGER, 1833 PADA BEBERAPA SEL KANKER

Cytotoxicity and Apoptosis Induction of Ethanol Extract Holothuria atra Jaeger, 1833 on Cancer Cells

Ernie Halimatushadyah¹, Muhammad Da'i¹, dan Muhammad Nursid^{2*}

¹ Magister Farmasi, Sekolah Pasca Sarjana, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Jl. A. Yani Tromol Pos I Surakarta, Jawa Tengah, Indonesia

² Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, Badan Riset dan Sumber Daya Manusia Kelautan dan Perikanan, Jl. KS.Tubun Petamburan VI Jakarta Pusat, Indonesia

*Korespondensi Penulis: muhammadnursid@gmail.com

Diterima: 21 Juni 2018; Direvisi: 31 Oktober 2018; Disetujui: 20 Desember 2018

ABSTRAK

Teripang *Holothuria atra* merupakan biota laut yang banyak ditemukan di perairan Indonesia yang termasuk dalam filum *Echinodermata* dan berpotensi sebagai antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sitotoksitas dan induksi apoptosis ekstrak etanol teripang *H. atra* secara *in vitro* terhadap beberapa sel lestari. Pengujian sitotoksitas dilakukan dengan metode MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) menggunakan sel HeLa, T47D, WiDr dan sel normal Vero, sedangkan uji induksi apoptosis dilakukan terhadap sel dengan hasil uji sitotoksitas terbaik menggunakan metode *flowcytometry* dan *double staining*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol teripang *H. atra* mampu menghambat pertumbuhan sel kanker HeLa, T47D dan WiDr. Nilai IC₅₀ ekstrak *H. atra* terhadap ketiga sel tersebut masing-masing sebesar 41,06±4,21; 20,89±1,55; 26,50±4,43 µg/ml tetapi ekstrak tersebut memiliki sitotoksitas yang lebih rendah terhadap sel Vero (IC₅₀ sebesar 128,00). Analisis *flowcytometry* dan *double staining* pada sel T47D memperlihatkan bahwa ekstrak etanol teripang *H. atra* mampu menginduksi apoptosis pada sel tersebut.

KATA KUNCI: teripang, *Holothuria atra*, sitotoksitas, induksi apoptosis

ABSTRACT

Holothuria atra is the marine organism found in Indonesian waters which is included in the phylum of Echinodermata and has the potential as an anticancer. This research aims to determine the cytotoxicity and apoptosis induction of ethanol extract of sea cucumber *H. atra* *in vitro* on cancer cell lines. This cytotoxicity test was conducted by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay using HeLa, T47D, and WiDr cancer cell lines while apoptosis induction test was conducted on cell which had the best cytotoxicity result by flowcytometry and double staining. The results showed that ethanol extract of *H. atra* was able to inhibit the growth of HeLa, T47D and WiDr cell lines with IC₅₀ of 41,06±4,21; 20,89±1,55; 26,50±4,43 µg/ml respectively, however, the extract had lower cytotoxicity to normal Vero cells. Flowcytometry and double staining analysis showed that ethanol extract of sea cucumber *H. atra* was able to induce apoptosis in T47D cell.

KEYWORDS: sea cucumber, *Holothuria atra*, cytotoxicity, apoptosis induction

PENDAHULUAN

Kanker adalah penyakit yang ditandai dengan pertumbuhan sel secara abnormal yang dapat menyerang bagian tubuh atau organ lain (WHO, 2018). Data yang diperoleh dari *World Health Organization* (WHO) pada tahun 2015, sekitar 8,8 juta kematian disebabkan oleh kanker. Jumlah kasus ini diperkirakan

akan meningkat menjadi 17 juta kematian per tahun pada tahun 2030 (Donepudi et al., 2014). Terapi yang dapat dilakukan untuk mengatasi kanker antara lain: kemoterapi, radioterapi, terapi antiendokrin, terapi target khusus, dan operasi (Mulrane et al., 2013). Penggunaan agen kemoterapi yang berkepanjangan dapat menimbulkan efek samping dan resistensi karena kurang selektifnya agen kemoterapi terhadap

sel kanker (Rachmani & Sehesti, 2012). Pada saat ini pemanfaatan produk bahan alam telah menjadi alternatif dan banyak diminati dalam pengobatan kanker (Hussain, Fareed, Ansari, & Sajid, 2012).

Sebagian besar wilayah Indonesia, sekitar 75% merupakan wilayah kelautan. Keanekaragaman hayati perairan laut Indonesia memberi peluang untuk memanfaatkan biota laut dalam pencarian metabolit sekunder senyawa bioaktif baru (Chasanah, 2008). Salah satu biota laut yang banyak ditemukan di perairan Indonesia adalah teripang atau timun laut yang termasuk dalam filum *Echinodermata* (Bordbar, Anwar, & Saari, 2011). Teripang memiliki senyawa metabolit sekunder antara lain flavonoid, fenol, terpenoid, saponin dan alkaloid (Dhinakaran & Lipton, 2014). Triterpen glikosida yang termasuk dalam senyawa saponin pada teripang dilaporkan memiliki efek biologis antara lain sebagai antijamur, antioksidan, dan antikanker (Li, Himaya, & Kim, 2013).

Aktivitas antikanker dapat ditunjukkan dengan nilai *inhibition concentration 50* (IC_{50}), nilai IC_{50} merupakan konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi suatu senyawa untuk dimanfaatkan dalam terapi kanker. Metode umum yang digunakan dalam pengukuran nilai IC_{50} , yaitu uji *methylthiazoldiphenyl tetrazolium* (MTT), sedangkan untuk mengetahui mekanisme kematian sel dapat dilakukan dengan pengujian induksi apoptosis. Induksi apoptosis pada sel kanker menjadi suatu hal yang menjanjikan dalam pengobatan kanker karena sel kanker akan mengalami bunuh diri secara spesifik tanpa mengganggu sel sehat dan tidak menimbulkan inflamasi (Wong, 2011). Althunibat et al., (2013) melaporkan bahwa ekstrak akuades *Holothuria edulis* dapat menghambat sel kanker TE1 dengan IC_{50} 78,0 μ g/ml dan A549 dengan IC_{50} 132,0 μ g/ml. Peneliti lain juga melaporkan bahwa komponen asam lemak jenuh dari teripang *Holothuria* sp. mampu menghambat sel MCF-7 dengan IC_{50} 10,32 ppm (Chasanah, Januar, & Nursid, 2014).

Penggunaan sel lestari untuk pengujian sitotoksik sekarang ini semakin diminati karena dengan menggunakan sel, mekanisme toksisitas biokimia dapat dikerjakan lebih efektif dan kondisi lingkungan sel mudah dikontrol. Pengembangan metode *in vitro* sebagai alternatif pengganti uji dengan menggunakan hewan uji mempunyai relevansi yang cukup baik yang bertujuan untuk mendeteksi potensi suatu obat pada manusia (Freshney, 2005).

Pada Penelitian ini dilakukan pengujian sitotoksitas ekstrak teripang *Holothuria atra* yang merupakan salah satu jenis teripang yang banyak ditemukan di Perairan Indonesia (Husain, Tamanampo & Manu, 2017) terhadap sel kanker serviks (HeLa), sel kanker payudara (T47D), dan sel kanker kolon

(WiDr). Jenis sel tersebut digunakan dalam penelitian ini karena kanker tersebut paling banyak diderita dan paling banyak penyebab utama kematian akibat kanker pada wanita (Kemenkes, 2013). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sitotoksitas dan induksi apoptosis ekstrak etanol teripang *H. atra* terhadap beberapa sel lestari kanker.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Simplisia yang digunakan adalah teripang (*H. atra*) segar yang diperoleh dari Perairan Jailolo, Halmahera, Maluku Utara, kemudian dideterminasi di Pusat Penelitian Oseanografi LIPI, Jakarta. Teripang yang digunakan pada penelitian ini merupakan teripang segar yang berukuran 10-20 cm. Teripang dicuci dan dibuang *viscera* atau bagian pencernaannya. Sel uji yang digunakan pada penelitian ini adalah beberapa sel kanker yaitu sel HeLa (sel kanker leher rahim), T47D (sel kanker payudara), WiDr (sel kanker kolon) dan sel Vero (sel normal ginjal monyet hijau Afrika) dari Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta. Penelitian telah mendapatkan persetujuan *ethical clearance* dari Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.

Metode

Ekstraksi

Simplisia yang digunakan dalam pengujian ini adalah simplisia segar (3365,9 g). Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi, simplisia *H. atra* dalam etanol 96% dengan perbandingan 1 : 2. pada bejana kaca, ditutup rapat dan dibiarkan selama 24 jam. Selama proses perendaman dilakukan pengadukan beberapa kali, kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring. Ampas yang diperoleh direndam kembali dengan pelarut etanol yang baru (kurang lebih 6 kali perlakuan). Maserat yang diperoleh secara keseluruhan dipekatkan dengan rotari evaporator hingga kental. Kemudian dipindahkan ke dalam konikel dan dikeringkan dengan *freeze dryer*.

Identifikasi kandungan metabolit sekunder

Identifikasi metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etanol teripang (*H. atra*) meliputi pemeriksaan steroid, triterpenoid, flavonoid, alkaloid, dan saponin dengan prosedur mengikuti protokol yang tertera dalam Harbone (1987).

Uji sitotoksitas dengan metode MTT assay

Uji sitotoksitas dilakukan menurut metode Nursid, Chasanah, Murwantoko, dan Wahyouno (2011)

dengan sedikit modifikasi. Suspensi sel sebanyak 1×10^4 sel dalam media kultur lengkap dimasukkan sebanyak 100 μl ke dalam mikroplat 96 sumuran. Sel yang telah terdistribusi tersebut dimasukkan ke dalam inkubator CO_2 pada suhu 37°C . Setelah semalam, media yang berisi sel tersebut dibuang kemudian dimasukkan seri konsentrasi zat uji ke dalam sumuran sebanyak 100 μl . Mikroplat kemudian diinkubasi kembali ke dalam inkubator CO_2 selama 24 jam untuk melihat efek sitotoksik. Menjelang akhir inkubasi, kondisi sel didokumentasi untuk setiap perlakuan. Selanjutnya disiapkan MTT (0,5 mg/ml). Mikroplat dikeluarkan dari inkubator CO_2 dan media yang berisikan perlakuan tersebut dibuang dan ditambahkan 100 μl MTT ke dalam setiap sumuran, termasuk kontrol sel dan kontrol media. Sel tersebut kemudian diinkubasi di inkubator CO_2 selama 2-4 jam. Kondisi sel setelah pemberian MTT diamati dengan mikroskop *inverted* untuk melihat formazan yang telah terbentuk. Jika formazan sudah terbentuk reaksi MTT dihentikan dengan menambahkan Sodium Dedosil Sulfat (SDS) 10%. Mikroplat diinkubasi di tempat gelap pada suhu kamar semalam. Absorbansi masing-masing sumuran dibaca dengan mikroplat *reader* pada panjang gelombang 560 nm (Biorad). Data absorbansi tiap sumuran digunakan untuk menghitung viabilitas sel. Analisis regresi linear digunakan untuk menghitung IC_{50} .

Sel yang digunakan pada pengujian ini adalah sel HeLa, T47D, WiDr dan sel normal Vero sebagai pembanding. Uji dilakukan sebanyak satu kali dengan 3 replikasi dan dilakukan pengujian pendahuluan untuk menentukan konsentrasi ekstrak teripang *H. atra*. Selektivitas ditentukan dengan menggunakan parameter SI (*Selectivity Index*) dengan cara membagi nilai IC_{50} pada sel normal dengan IC_{50} sel kanker (Sutejo, Putri, & Meiyanto, 2016). Sel yang memiliki nilai IC_{50} dan SI yang terbaik lalu digunakan untuk uji selanjutnya untuk mengetahui efek ekstrak teripang dalam kemampuan menginduksi apoptosis.

Uji Apoptosis dengan analisis *flowcytometric*

Uji dilakukan menurut metode Nursid et al. (2011). Setelah sel diberi perlakuan dengan sampel uji dan doksorubisin sebagai kontrol positif selama 24 jam, sel dipanen. Sel dipanen dengan menambahkan 1 ml *Phosphate Buffer Saline* (PBS) kemudian di tampung ke dalam tabung konikel setelah itu di tambah 150 μl tripsin-EDTA 0,25% dan diinkubasi selama 3 menit. Setelah sel terlepas, ditambahkan 1 ml media kultur kemudian diresuspensi, ke dalam campuran lalu ditambahkan 2 ml PBS. Sel disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pelet yang diperoleh ditambahkan 1 ml PBS, dihomogenkan lalu dipindahkan ke dalam

tabung mikro. Tabung mikro disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 3 menit kemudian diberi perlakuan dengan 100 μl *Annexin-V-FLUOS staining kit*. Inkubasi dilakukan di dalam ruang gelap selama 10 menit pada suhu $25 - 27^\circ\text{C}$. Histogram sel-sel apoptosis dan nekrosis dianalisis dengan *flowcytometer* (Becton-Dickinson).

Uji Apoptosis dengan Metode *Double Staining*

Uji dilakukan menurut metode Kwan et al. (2015). Disiapkan sejumlah cover slip kemudian dimasukkan ke dalam mikroplat 24 sumuran. Suspensi sel yang telah dihitung jumlahnya (5×10^5 sel) dalam media kultur lengkap ditransfer sebanyak 1 ml ke atas cover slip. Sel yang telah terdistribusi tersebut dimasukkan ke dalam inkubator CO_2 pada suhu 37°C selama semalam. Setelah semalam, media yang berisi sel tersebut dibuang dan sampel uji dimasukan kedalam sumuran sebanyak 1 ml. Mikroplat kemudian diinkubasi selama 10 jam dalam inkubator CO_2 . Mikroplat yang telah selesai diinkubasi dikeluarkan dari inkubator kemudian media pada sumuran dibuang. Sel dalam sumuran dicuci dengan PBS sebanyak 1 ml. PBS dari sumuran dibuang dengan mikropipet secara perlahan. Cover slip diambil dengan hati-hati kemudian diletakan diatas objek glass. Sebanyak 10 μl reagen campuran *etidium bromida – akridin orange* diteteskan diatas cover slip. Sel kemudian diamati dibawah mikroskop fluorosen (Olympus).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi Teripang

Ekstrak kering yang dihasilkan sebesar 25,9 g dengan rendemen sebesar 0,77%. Azwanida (2015) menyatakan bahwa hasil ekstrak yang diperoleh dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti metode yang digunakan, pelarut, temperatur, perbandingan pelarut serta lamanya waktu ekstraksi.

Identifikasi Kandungan Metabolit Sekunder

Ekstrak etanol teripang *H. atra* menunjukkan adanya kandungan triterpenoid, flavonoid, alkaloid, dan saponin. Pengamatan identifikasi kandungan metabolit sekunder dapat dilihat pada Tabel 1.

Hasil pengamatan menunjukkan adanya kesesuaian dengan penelitian Dhinakaran dan Lipton (2014) yang menjelaskan bahwa ekstrak *H. atra* mengandung flavonoid, fenol, terpenoid, saponin dan alkaloid. Caulier, Dyck, Gerbaux, Eeckhaut, dan Flammang (2011) melaporkan bahwa kandungan saponin pada teripang *H. atra* banyak terdapat pada bagian dinding tubuhnya. Beberapa jenis saponin

Tabel 1. Identifikasi metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etanol teripang *H. atra*
 Table 1. Identification of secondary metabolites in ethanol extract sea cucumber *H. atra*

Golongan Metabolit Sekunder/ Secondary Metabolite Group	Pengamatan/Observation	Hasil/Result
Steroid	Terbentuk warna biru atau ungu/Blue or purple colour was formed	Negatif/Negative (-)
Triterpenoid	Terbentuk warna merah/Red colour was formed	Positif/Positive (+)
Flavonoid	Terbentuk warna merah atau jingga/Red or orange colour was formed	Positif/Positive (+)
Alkaloid	Terbentuk endapan putih atau coklat/White or brown deposits were formed	Positif/Positive (+)
Saponin	Terbentuk buih/Foam was formed	Positif/Positive (+)

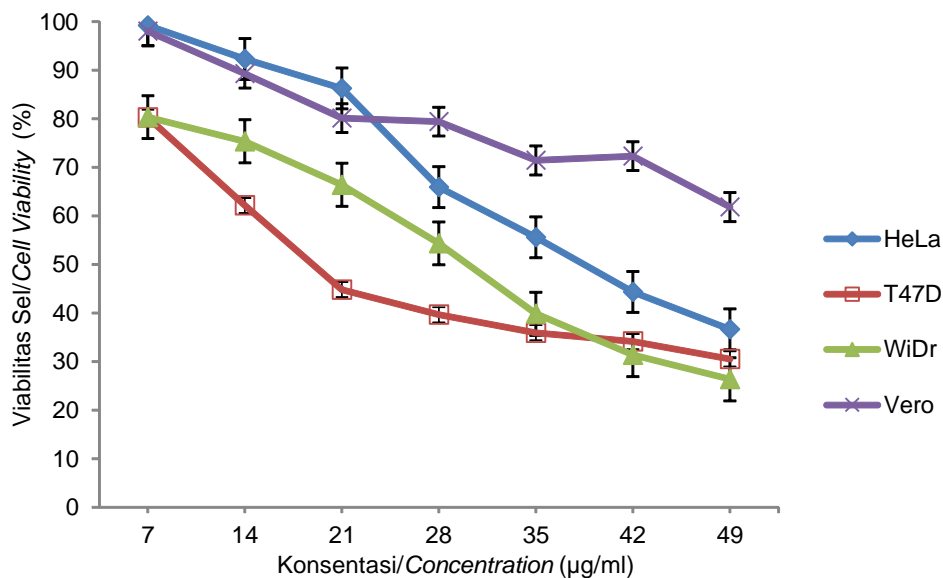
(triterpen glikosida) dari teripang yang telah teridentifikasi, antara lain: holothurin B₁, holothurin B₂, holothurin B₃ dan holothurin B/B₄ yang memiliki aktivitas sebagai antikanker.

Sitotoksitas Ekstrak Teripang

Sitotoksitas ekstrak teripang dalam penelitian ini diuji dengan metode MTT. Metode ini dapat digunakan untuk mengukur proliferasi sel secara kolorimetri. Metode ini berdasarkan pada perubahan garam tetrazolium 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) menjadi kristal

formazan dalam mitokondria yang aktif pada sel hidup. Kristal formazan yang terbentuk dapat dilarutkan dengan pelarut tertentu yang kemudian absorbansinya dapat dibaca dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 560 nm (Ebada, Edrada, Lin, & Proksch, 2008).

Dalam penelitian ini, konsentrasi larutan uji ekstrak etanol teripang *H. atra* yang digunakan yaitu 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 µg/ml. Penggunaan konsentrasi pada zat uji tersebut berdasarkan orientasi konsentrasi sebelumnya. Hasil pemberian larutan uji pada konsentrasi rendah yaitu 7 µg/ml menunjukkan



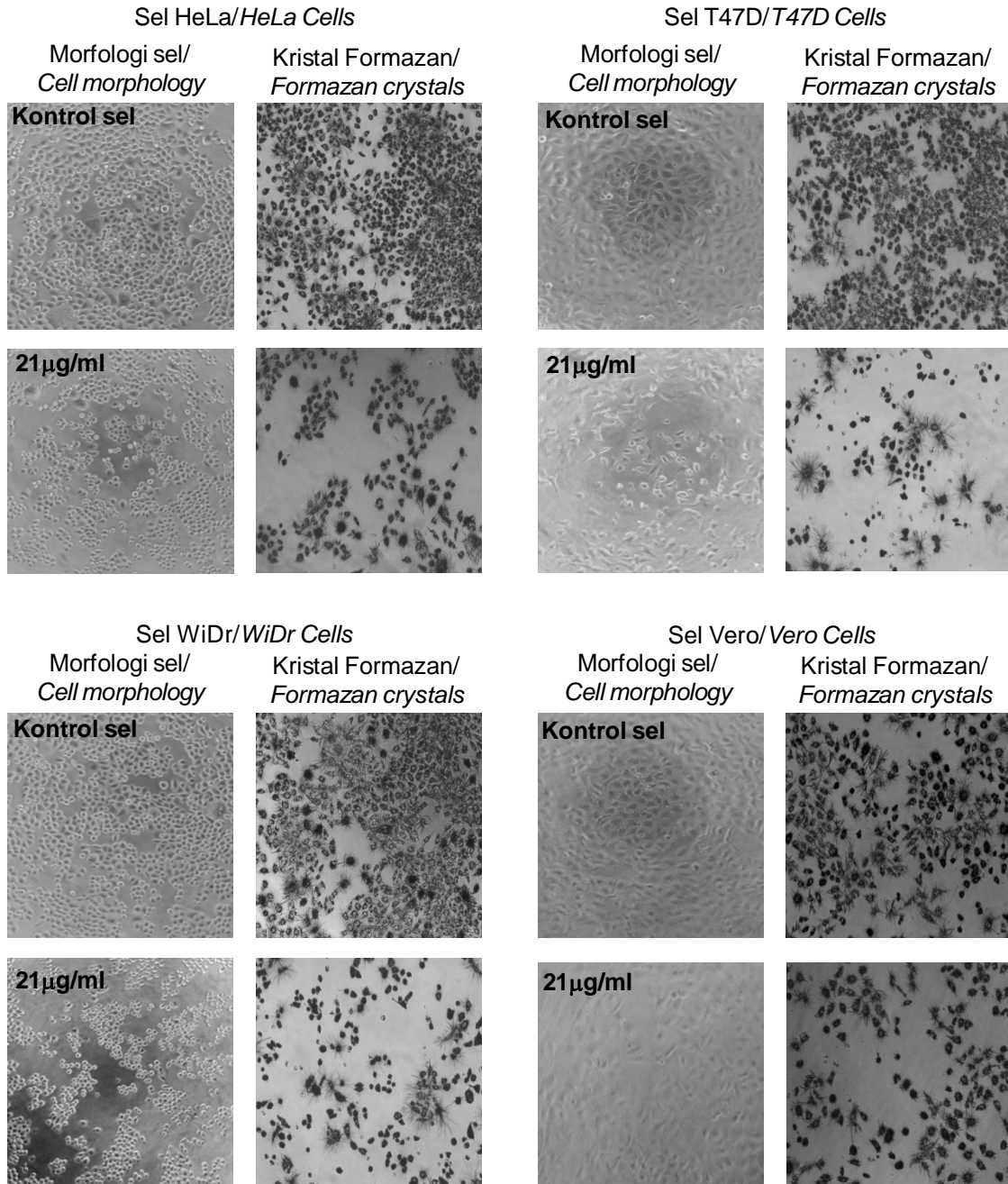
Gambar 1. Uji sitotoksitas ekstrak ethanol *H. atra* terhadap sel HeLa, T47D, WiDr dan Vero dengan berbagai konsentrasi

Figure 1. Cytotoxicity of ethanol extract of *H. atra* against HeLa, T47D, WiDr and Vero cell lines at various concentrations

populasi sel yang hidup masih banyak berkisar 80-100%, sedangkan dengan meningkatnya konsentrasi, sel yang hidup semakin berkurang (Gambar 1). Aktivitas sitotoksik dapat ditandai dengan adanya perubahan morfologi sel. Perubahan morfologi yang telah diberi perlakuan dibandingkan dengan sel kontrol dapat diamati melalui mikroskop. Hasil pengamatan sel HeLa, T47D, WiDr dan sel Vero yang telah diberi perlakuan ekstrak pada salah satu seri konsentrasi

yang digunakan yaitu 21 µg/ml dapat dilihat pada Gambar 2.

Berdasarkan *National Cancer Institute*, ekstrak dinyatakan aktif memiliki aktivitas antikanker apabila memiliki nilai $IC_{50} < 30 \mu\text{g/ml}$, moderate aktif apabila memiliki nilai $30 \leq IC_{50} \leq 100 \mu\text{g/ml}$ dan tidak aktif apabila nilai $IC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$ (Putram, Setyaningsih, Tarman, & Nursid, 2017). Hasil analisis memperlihatkan bahwa ekstrak teripang *H. atra*



Gambar 2. Morfologi sel kanker dengan perlakuan ekstrak etanol teripang *H. atra* pada konsentrasi 21 µg/ml.
Figure 2. Cancer cell morphology treated by 21 µg/ml ethanol extract of sea cucumber *H. atra*

Tabel 2. Nilai IC₅₀ ekstrak etanol teripang *H. atra* terhadap beberapa jenis sel dan indeks selektivitasnya (IS)
 Table 2. IC₅₀ value of ethanol extract of sea cucumber *H. atra* on cancer cell lines and their selectivity Index (SI)

Jenis Sel/Cell Type	IC ₅₀ (µg/ml)/ IC ₅₀ (µg/ml)	Indeks selektivitas (IS)/ Selectivity Index (SI)
Sel HeLa/HeLa Cells	41.06±4.21	3.13
Sel T47D/T47D Cells	20.89±1.55	6.12
Sel WiDr/WiDr Cells	26.50±4.43	4.83
Sel Vero/Vero Cells	128.00±2.98	1.00

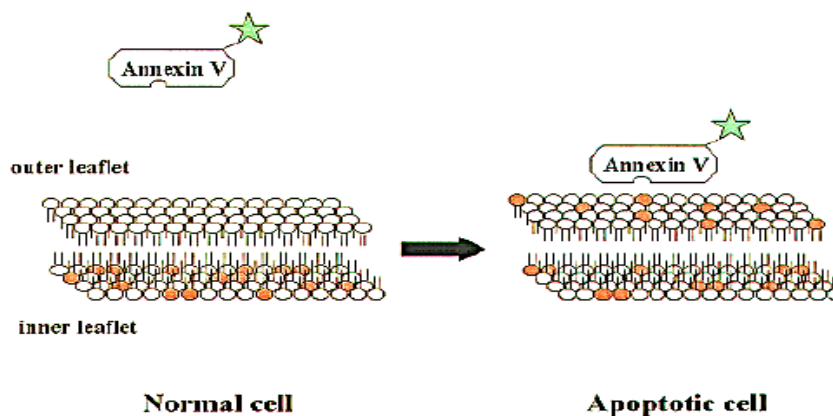
termasuk dalam kategori aktif terhadap sel T47D dan WiDr dengan nilai IC₅₀ sebesar 20,89±1,55 dan 26,50±4,43 µg/ml, serta moderat aktif pada sel HeLa dengan IC₅₀ sebesar 41,06±4,21 µg/ml (Tabel 2). Nilai IC₅₀ ekstrak terhadap sel Vero sebesar 128,00µg/ml. Dhinakaran dan Lipton (2014) melaporkan bahwa ekstrak metanol *H. atra* yang diperoleh dari perairan Samudra Hindia memiliki aktivitas sitotoksik pada sel HeLa dengan nilai IC₅₀ sebesar 468 µg/ml dan pada sel MCF-7 dengan nilai IC₅₀ sebesar 352 µg/ml.

Selectivity Index diperoleh dari nilai IC₅₀ suatu senyawa terhadap sel normal dibagi dengan nilai IC₅₀ terhadap sel kanker (Demirgan et al., 2016). Sel normal yang digunakan adalah sel Vero. Sel Vero berasal dari ginjal monyet hijau Afrika, sel ini merupakan sel kultur yang berasal dari mamalia (Ammerman, Beier-Sexton, & Azad, 2008). Pengujian dengan menggunakan sel Vero dapat memberikan perkiraan sitotoksitas terhadap sel normal manusia. Nilai SI>2,0 berarti bahwa suatu senyawa dianggap memiliki selektivitas yang tinggi. Semakin tinggi indeks selektivitas suatu senyawa terhadap sel, maka senyawa tersebut semakin selektif dalam mematikan

atau menghambat pertumbuhan suatu sel kanker dengan efek yang semakin kecil terhadap sel normal (Demirgan et al., 2016). Berdasarkan nilai IC₅₀ dan nilai SI, maka sel T47D digunakan dalam penelitian berikutnya untuk mengetahui efek ekstrak teripang dalam kemampuannya menginduksi apoptosis.

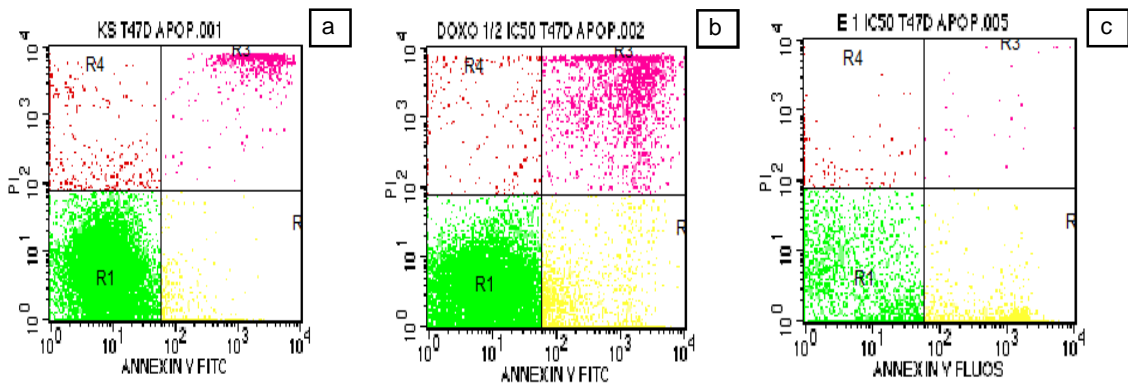
Uji Apoptosis dengan Analisis Flowcytometric

Pengujian apoptosis ini menggunakan FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II. Prinsip dari kit ini adalah menggunakan Annexin V yang berkonjugasi dengan fluorescein isothiocyanate (FITC) untuk mengikat phosphatidylserine (PS) pada permukaan sel yang mengalami apoptosis (Gambar 3). Phosphatidylserine (PS) merupakan aminofosfolipid yang akan berpindah posisi dari membran internal ke membran eksternal pada saat apoptosis. Annexin V adalah protein yang memiliki afinitas tinggi terhadap fosfolipid yang bermuatan negatif dengan adanya ion Ca²⁺. Kalsium yang terdapat dalam Annexin V tersebut mampu mengikat Phosphatidylserine (PS) yang berada di luar membran plasma yang mengalami apoptosis. Translokasi PS pada permukaan sel



Gambar 3. Skema pengikatan Annexin V terhadap membran sel yang mengalami apoptosis (Engeland, Nieland, Ramaekers, Schutte, & Reutelingsperger, 1998).

Figure 3. Scheme of Annexin V binding to cell membranes undergo apoptosis (Engeland, Nieland, Ramaekers, Schutte, & Reutelingsperger, 1998).



Keterangan : (a) kontrol sel (b) doksorubisin 0,1µg/ml (c) ekstrak etanol teripang *H. atra* dengan konsentrasi 20 µg/ml.
 Description: (a) cell control (b) doxorubicin 0.1 µg/ml (c) ethanol extract of sea cucumber *H. atra* with concentration of 20 µg/ml.

Gambar 4. Hasil analisis *flowcytometric*
 Figure 4. Results of *flowcytometric* analysis

menjadikan ikatan Annexin V sebagai penanda apoptosis (Crowley, Marfell, Scott, & Waterhouse, 2016).

Penambahan Propidium Iodida (PI) pada sel kanker digunakan sebagai penanda terjadinya nekrosis. Rangkaian pemberian Annexin V- FITC dan PI ini dapat membedakan sel yang hidup, sel yang mengalami apoptosis, dan sel yang mengalami nekrosis. Analisis tersebut dapat dilakukan dengan menggunakan *flowcytometer* (Nursid, Namirah, Cahyana, & Fajarningsih, 2015).

Analisis *flowcytometry* pada penelitian ini menggunakan dosis sebesar 20µ/ml. Dosis ini digunakan karena nilai IC₅₀ ekstrak terhadap sel T47D berkisar 20 µg/ml (Tabel 2), sehingga diharapkan pada dosis ini sel yang hidup maupun yang apoptosis dapat dibedakan. Hasil analisis *flowcytometry* (Gambar 4) menunjukkan bahwa persentase kematian sel dengan mekanisme apoptosis lebih besar dibandingkan

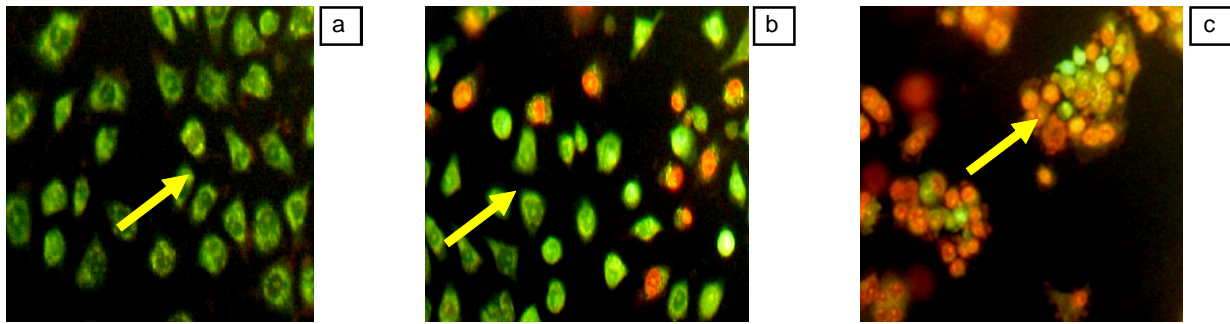
dengan nekrosis pada ekstrak *H. atra* maupun pada doksorubisin. Ekstrak etanol teripang *H. atra* dengan konsentrasi 20 µg/ml dapat menginduksi apoptosis sebesar 82,06 % pada sel payudara T47D. Ekstrak teripang *H. atra* memiliki persentase apoptosis lebih besar dibandingkan dengan doksorubisin karena mekanisme doksorubisin yang berbeda. Doksorubisin merupakan agen kemoterapi yang digunakan pada penderita kanker payudara dengan mekanisme interkelas DNA dan menghambat topoisomerase II sehingga mengakibatkan penghambatan sintesis DNA (Thorn et al., 2011). Nilai persentase apoptosis, nekrosis, dan sel yang tetap hidup dapat dilihat pada Tabel 3.

Analisis Apoptosis dengan *Double Staining*

Pengamatan secara visual pada sel yang mengalami apoptosis dapat dideteksi dengan pengecatan menggunakan akridine oranye-etidium

Tabel 3. Hasil analisis *flowcytometric*
 Table 3. Results of *flowcytometric* analysis

Sampel/ Sample	Persentase/Percentage (%)			
	Sel yang hidup/ Live cells	Apoptosis awal/ Early apoptotic	Apoptosis akhir/ Late apoptotic	Nekrosis/ Necrosis
Kontrol sel/Cell control	91.89	2.46	3.89	1.80
Doksorubisin/Doxorubicin (0.1 µg/ml)	73.33	15.04	10.27	1.46
Ekstrak etanol teripang <i>H. Atra</i> / Ethanol extract of sea cucumber <i>H. atra</i> (20 µg/ml)	17.18	82.06	0.15	0.65



Keterangan : (a) kontrol sel (b) doxorubisin 0,1 µg/ml (c) ekstrak etanol teripang *H. atra* dengan konsentrasi 20 µg/ml.

Description : (a) cell control (b) doxorubicin 0.1 µg/ml (c) ethanol extract of sea cucumber of *H. atra* with concentration of 20 µg/ml.

Gambar 5. Hasil pengamatan Apoptosis Sel T47D menggunakan mikroskop fluoresens (perbesaran 100x)
Figure 5. Result of T47D cell apoptosis using fluorescent microscope (magnification of 100x)

bromida (Kwan et al., 2015). Metode ini berdasarkan fluoresensi DNA pada sel yang hidup dan sel yang mati karena adanya pengikatan akridine oranye-etidium bromida. Pada hasil pengamatan terlihat bahwa kontrol sel (Gambar 5a) berwarna hijau. Warna hijau berasal dari akridine oranye yang menembus seluruh bagian sel hidup dengan membran yang utuh dan memiliki nukleus. Pada sel yang diberi perlakuan doxorubisin dan ekstrak teripang *H. atra* (Gambar 5b dan 5c) terdapat warna oranye yang menggambarkan sel T47D yang mati. Warna oranye tersebut disebabkan karena etidium bromida yang berinteraksi dengan sel rusak pada membran dan nukleus (Ribble, Goldstein, Norris, & Shellman, 2005). Warna oranye pada perlakuan ekstrak (Gambar 5c) lebih banyak dibandingkan dengan doxorubisin (Gambar 5b). Berdasarkan persentase sel yang mengalami apoptosis pada data Tabel 3, sel T47D yang mengalami apoptosis setelah diberikan perlakuan ekstrak *H. atra* berjumlah 82,06%. Sedangkan jumlah persentase sel yang mengalami apoptosis setelah diberikan doxorubisin hanya 15,04%. Hal tersebut yang menyebabkan warna oranye pada sel T47D yang diberi perlakuan ekstrak lebih dominan dibanding pada sel perlakuan doxorubisin.

Hasil uji secara umum menunjukkan bahwa ekstrak teripang *H. atra* memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan sel kanker terutama pada sel kanker T47D. Kemampuan penghambatan tersebut melalui mekanisme apoptosis yang dibuktikan melalui pengujian *flowcytometry* dan analisis *double staining*. Kedua hasil analisis tersebut dapat menggambarkan mekanisme kematian sel yang disebabkan karena adanya apoptosis baik secara kuantitatif maupun secara kualitatif. Induksi apoptosis menjadi suatu hal yang menjanjikan dalam pengobatan kanker. Pada

sel kanker, sel akan mengalami kehilangan kemampuan apoptosis dan sel berproliferasi sangat cepat. Strategi pengobatan ini dapat mengembalikan jalur sinyal apoptosis menjadi normal sehingga berpotensi untuk menghilangkan sel kanker (Wong, 2011).

KESIMPULAN

Ekstrak etanol teripang *Holothuria atra* Jaeger, 1833 mempunyai aktivitas sitotoksitas terhadap beberapa sel kanker yaitu sel HeLa, T47D dan WiDr dengan IC_{50} masing-masing sebesar $41,06 \pm 4,21$; $20,89 \pm 1,55$ dan $26,50 \pm 4,43$ µg/ml, namun memiliki sitotoksitas yang lebih rendah terhadap sel Vero dengan nilai IC_{50} sebesar 128,00 µg/ml. Penghambatan terbesar terjadi pada sel T47D, dengan mekanisme penghambatan sel tersebut melalui induksi apoptosis.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan (BBRP2BKP) dan Universitas Muhammadiyah Surakarta yang telah memfasilitasi dan membiayai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Althunibat, O. Y., Ridzwan, B. H., Taher, M., Daud, J. M., Jauhari Arief Ichwan, S., & Qaralleh, H. (2013). Antioxidant and cytotoxic properties of two sea cucumbers, *Holothuria edulis* lesson and *Stichopus horrens* Selenka. *Acta Biologica Hungarica*, 64(1), 10–20. <https://doi.org/10.1556/ABiol.64.2013.1.2>
- Ammerman, N. C., Beier-Sexton, M., & Azad, A. F. (2008). Growth and maintenance of vero cell line. *Curr Protoc Microbiol*, 1-10. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca04es11>.

- Azwanida. (2015). A Review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength, and limitation. *Medical & Aromatic Plants*, 4(3), 3–8. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>
- Bordbar, S., Anwar, F., & Saari, N. (2011). High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods -A review. *Marine Drugs*, 9(10), 1761–1805. <https://doi.org/10.3390/md9101761>
- Caulier, G., Dyck, S., Gerbaux, P., Eeckhaut, I., & Flammang, P. (2011). Review of saponin diversity in sea cucumbers belonging to the family *Holothuriidae*. *SPC Beche-de-Mer Information Bulletin*, 31(January), 48–54.
- Chasanah, E. (2008). Marine biodiscovery research in indonesia: challenges and rewards. *Journal of Coastal Development*, 12(1), 1–12.
- Chasanah, E., Januar, H. I., & Nursid, M. (2014). Cytotoxic saturated fatty acids from the Indonesian sea cucumber *Holothuria* sp . *Squalen Bull. of Mar. & Fish. Post. & Biotech.*, 9(1), 11–15. <https://doi.org/10.15578/squalen.v9i1.69>
- Crowley, L. C., Marfell, B. J., Scott, A. P., & Waterhouse, N. J. (2016). Quantitation of apoptosis and necrosis by Annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. *Cold Spring Harbor Protocol*, 953-958. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087288>
- Demirkan, R., Karagöz, A., Pekmez, M., Önay-Uçar, E., Artun, F. T., Güreç, Ç., & Mat, A. (2016). In vitro anticancer activity and cytotoxicity of some papaver alkaloids on cancer and normal cell lines. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 13, 22-26. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4314/ajtcam.v13i3.3>
- Dhinakaran, D. I., & Lipton, A. P. (2014). Bioactive compounds from *Holothuria atra* of Indian ocean. *SpringerPlus*, 4, 673. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-673>
- Donepudi, M. S., Kondapalli, K., Jeevan, A. S., & Pavithra, V. (2014). Breast cancer statistics and markers. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 10(3). <https://doi.org/10.4103/0973-1482.137927>
- Ebada, S. S., Edrada, R. A., Lin, W., & Proksch, P. (2008). Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. *Nature Protocols*, 3(12), 19-23. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.182>
- Engeland, M. Van, Nieland, L. J. W., Ramaekers, F. C. S., Schutte, B., & Reutelingsperger, C. P. M. (1998). Annexin V-Affinity Assay/ : A Review on an apoptosis detection system based on *Phosphatidylserine* exposure. *Cytometry*, 9(31), 1-9.
- Freshney, R. I. (2005). *Culture of animal cells: a manual of basic technique* (Fifth Fdit). John Wiley & Sons.
- Harbone, J. (1987). *Metode fitokimia, penuntun cara modern menganalisis tumbuhan*. Penerbit ITB Bandung.
- Husain, G., Tamanampo, J. F. W. , & Manu, G. D. (2017). Struktur komunitas teripang (*Holothuridae*) di kawasan Pantai Pulau Nyaregilaguramangofa Kec. Jailolo Selatan Kab. Halmahera Barat Maluku Utara. *Jurnal Ilmiah Platax*, 5(2), 177-188
- Hussain, S., Fareed, S., Ansari, S., & Sajid, M. (2012). Marine natural products/ : a lead for anti-cancer. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 41(February), 27–39.
- Kemenkes, R. (2013). *Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) 2013*. Jakarta.
- Kwan, Y. P., Saito, T., Ibrahim, D., Al-hassan, F. M. S., Oon, C. E., Chen, Y., ... Sasidharan, S. (2015). Evaluation of the cytotoxicity , cell-cycle arrest , and apoptotic induction by *Euphorbia hirta* in MCF-7 breast cancer cells. *Pharmaceutical Biology*, 0(0), 1–14. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1064451>
- Li, Y. X., Himaya, S. W. A., & Kim, S. K. (2013). Triterpenoids of marine origin as anti-cancer agents. *Molecules*, 18(7), 7886–7909. <https://doi.org/10.3390/molecules18077886>
- Mulrane, L., Mcgee, S. F., Gallagher, W. M., Mulrane, L., Mcgee, S. F., Gallagher, W. M., & Connor, D. P. O. (2013). miRNA Dysregulation in breast cancer miRNA dysregulation in breast cancer. *American Association for Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1841>
- Nursid, M., Chasanah, E., Murwantoko, & Wahyouno, S. (2011). Isolation and identification of emestrin from *Emericella nidulans* and investigation of its anticancer properties. *Microbiology Indonesia*, 5, 160–169. <https://doi.org/10.5454/mi.5.4.3>
- Nursid, M., Namirah, I., Cahyana, A. H., & Fajarningsih, N. D. (2015). Emestrin B/ : Epipolythiodioxypiperazine from marine derived fungus *Emericella nidulans*. *Journal of Medical and Bioengineering*, 4(6), 441–445. <https://doi.org/10.12720/jomb.4.6.441-445>
- Putram, N. M., Setyaningsih, I., Tarman, K., & Nursid, M. (2017). Aktivitas antikanker dari fraksi aktif teripang. *JPHPI*, 20, 53–62. <https://doi.org/10.17844/jphpi.2017.20.1.53>
- Rachmani, E. P. N., & Sehesti, T. S. (2012). The Breast of Anticancer from leaf extract of *Annona muricata* againts cell line in T47D. *International Journal of Applied Science and Technology*, 2(1), 157–164.
- Ribble, D., Goldstein, N. B., Norris, D. A., & Shellman, Y. G. (2005). A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnology*, 7, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-5-12>
- Sutejo, I. R., Putri, H., & Meiyanto, E. (2016). Selektivitas ekstrak etanolik buah makassar (*Brucea javanica*) pada kanker payudara metastasis secara In Vitro. *Journal of Agromedicine and Medical Sciences*, 2(1), 1–5.
- Thorn, C. F., Oshiro, C., Marsh, S., Boussard, T. H., McLeod, H. L., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2011). Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adwers effect. *Pharmacogenet Genomics*, 21(7), 440–446. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833ffb56>.Doxorubicin
- WHO. (2018). WHO Cancer. Retrieved January 4, 2018, from <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Wong, R. S. Y. (2011). Apoptosis in cancer/ : from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1), 87. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87>

