

PEMUPUKAN DAN INDUKSI *Curcuma mangga* Val. UNTUK PENINGKATAN ZAT ANTIKANKER DAN UJI SITOTOKSITASNYA PADA T47D**(INCREASING ANTICANKER SUBSTANCES AND THE Cytotoxicity TEST ON T47D USING FERTILIZATION AND INDUCTION ON *Curcuma Mango* Val.)****Retno S. Sudibyo¹ dan Taryono²**¹Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada²Pusat Inovasi Agroteknologi Terpadu, Universitas Gadjah Mada

Bulaksumur Caturtunggal Depok Sleman Daerah Istimewa Yogyakarta 55281

email: retno.sudibyo@ugm.ac.id**Abstrak**

Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan zat antikanker dan uji sitotoksitasnya pada T47D dengan menggunakan metode pemupukan dan induksi pada tanaman *Curcuma mangga* Val. Penelitian dilaksanakan di Greenhouse milik Pusat Inovasi Agroteknologi Terpadu (PIAT) Universitas Gadjah Mada di Kalitirto, Kecamatan Berbah, Sleman, Yogyakarta. Waktu pelaksanaan awal Januari-Oktober 2019. Pelaksanaan penelitian dibagi menjadi 3 tahap. Tahap *pertama* penanaman dan pemupukan *C. mangga* Val. Pemupukan dilakukan menggunakan nitrogen (N) organik dari kompos daun-daun legume, fosfor (P) organik dari pupuk SP36, Kalium (K) dari KCl, dan kombinasi pupuk NPK. Tahap *kedua* adalah ekstraksi dan penetapan kandungan zat aktif menggunakan alat vaccum-rotavapor dan densitometer. Tahap *ketiga* adalah Uji sitotoksitas (MTT Assay) menggunakan bahan Sel T47D, media RPMI, MTT, PBS, SDS, dan bahan-bahan disposable, serta ELISA reader. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemupukan N organik pada *C. mangga* Val. mampu meningkatkan produksi minyak dalam rimpang dan sitotoksitas minyak terhadap sel kanker payudara T47D. Penghentian pemberian air menjelang masa dorman dan suhu lingkungan yang panas (>37°C) mampu menginduksi majunya masa dorman pada tanaman *C. mangga* Val.

Kata kunci: *Curcuma mangga* Val., sitotoksitas, T47D**Abstract**

This study was aimed at increasing the anticancer agent and conducting a cytotoxicity test on T47D by using fertilization and induction methods on *Curcuma* Val mango plant. The study was conducted at the Greenhouse of Agro-technology Innovation Center (AIC), Gadjah Mada University in Kalitirto, Berbah, Sleman, Yogyakarta. The study was conducted from January to October 2019. The research was divided into 3 stages. The *first* stage of planting and fertilizing *C. mango* Val. Fertilization was carried out using organic nitrogen (N) from compost of legume leaves, organic phosphorus (P) from SP36 fertilizer, Potassium (K) from KCl and NPK fertilizer combination. The *second* step is the extraction and the determination of the active ingredient using a vacuum-rotary evaporator and a densitometer. The *third* stage is the cytotoxicity test (MTT Assay) using T47D cell material, RPMI media, MTT, PBS, SDS and disposable materials, and ELISA reader. The results showed that organic N fertilization on *C. mango* Val. able to increase oil production in rhizomes and cytotoxicity of oil against T47D breast cancer cells. Discontinuation of water delivery prior to dormancy and hot ambient temperature (> 37°C) is able to induce the advancement of dormancy in *C. mango* Val plants.

Keywords: *Curcuma mangga* Val., cytotoxicity, T47D

PENDAHULUAN

Curcuma mangga Val. atau dikenal sebagai kunir mangga, banyak digunakan oleh masyarakat Yogyakarta dan sekitarnya sebagai antikanker. Ekstrak kloroform dan metanol rimpang juga menunjukkan potensi sitotoksik pada 7 macam sel kanker (Khasanah, 2002; Wahyuningsih, Mubarika, Bolhuis, Nooter, & Oostrum, 2003). Uji sitotoksik *in vitro* rimpang *C. mangga* Val. telah dilakukan pada komponen protein (Lestariana, Triandiyasih, Sismindari, & Mubarika, 2000; Sismindari, Sudibyo, & Astuti, 2004) dan minyak atsiri rimpang (Astuti, Sudibyo, Jenie, Mubarika, & Sismindari, 2015; Astuti, 2014; Budiman, 2001; Rumiati, *et al.*, 2007), dan menunjukkan hasil yang positif pada sel kanker Raji, Hela, Myeloma, MCF7, dan T47D.

Uji *in vitro* penelusuran mekanisme aksi antikanker minyak atsiri telah dilakukan melalui ekspresi beberapa protein yang berperan dalam apoptosis, proliferasi dan/atau daur sel kanker (Astuti Astuti *et al.*, 2015; Nurrokhman, 2004; Rumiati *et al.*, 2007; Wahyuningsih dkk., 2003). Hasil uji menunjukkan bahwa kemampuan sitotoksik *in vitro* komponen minyak atsiri memiliki aktifitas sitotoksik yang lebih kuat daripada komponen lain (Astuti, 2014). Uji *in silico* komponen minyak atsiri juga telah dilakukan terhadap reseptor ER α

dan EGFR (Sudibyo & Purnomo, 2019) yang merupakan reseptor yang berperan pada perkembangan kanker payudara (Song *et al.*, 2014). Berdasarkan potensi sitotoksik antikanker beserta penelusuran mekanisme aksinya dari kandungan minyak atsiri rimpang *C. mangga* Val. tersebut di atas, maka perlu dilakukan penelitian peningkatan produksi minyak atsiri *C. mangga* Val. mengingat kandungan minyak atsiri tersebut dalam rimpang sangat sedikit. Penelitian ini melakukan pemberian empat macam pemupukan dengan nitrogen (N) organik, fosfor (P) organik, kalium (K) anorganik, dan kombinasinya; serta induksi pengurangan pemberian air pada tanaman *C. mangga* Val. dalam masa tertentu untuk peningkatan kandungan minyak atsiri rimpang tanaman tersebut.

METODE PENELITIAN

Penanaman dan pemupukan *C. mangga* Val.: Bibit rimpang *C. mangga* Val. dari petani di Kecamatan Dlingo, Kabupaten Bantul, Yogyakarta. Pupuk N organik (daun klereside, lamtoro, orok-orok, dan turi), P organik (pupuk SP3) dan K anorganik (KCl). Ekstraksi dan penetapan kandungan zat aktif: n-Heksan, TLC *plates* (SilicaG₆₀F₂₅₄), alat *vaccum-rotavapor*, Densitometer. Uji sitotoksisitas (MTT *Assay*): Sel T47D, media RPMI, MTT, PBS, SDS, dan bahan-bahan *disposable*, serta ELISA *reader*.

Kelompok pemupukan. Tiap kelompok terdiri dari 4 pot. Kelompok 1. N organik, 2. P organik, 3. K anorganik, 4. Kombinasi NPK, 5. Kontrol (tanpa pupuk). Masing-masing pupuk diberikan 100 g per tiga bulan dan air 100 ml per hari. Untuk menginduksi tanaman memasuki metabolisme sekunder, menjelang masa dorman (sekitar tanaman umur 8 bulan) pemberian air dihentikan.

Ekstraksi dan penetapan minyak atsiri. Tiap rimpang hasil panen kelompok dicuci bersih, dirajang tipis dan dikering-anginkan pada suhu kamar. Rajangan kering dimaserasi dengan n-Heksan (5ml/g rimpang kering) selama 4 hari dengan setiap hari diaduk. n-Heksan diuapkan dari masing-masing maserat menggunakan *vaccum-rotavapor* pada suhu kamar. Ekstrak kental digunakan untuk penetapan kadar minyak melalui perbandingan densitas spot kromatografi lapis tipis (KLT) sampel terhadap spot minyak eugenol yang diketahui kadarnya. Ekstrak kental juga untuk uji sitotoksitas kandungan zat aktif minyak atsiri.

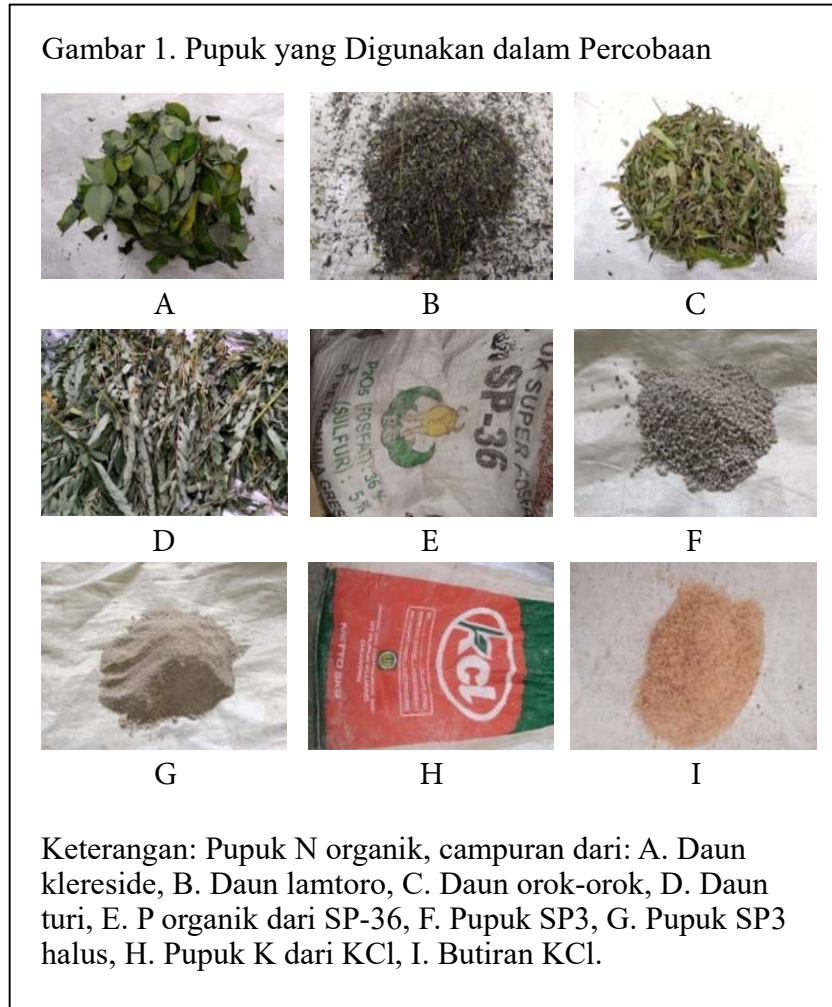
Uji sitotoksitas. Plat 96 sumuran diisi 1×10^4 sel T47D dalam media RPMI dan diinkubasi pada 37°C dalam inkubator CO₂ selama 24 jam. Jumlah kultur sel sesuai jumlah seri kadar ekstrak minyak, kontrol sel dan kontrol media dengan masing-masing tiga replikasi. Pada kultur sel ditambahkan seri kadar ekstrak kental *C. mangga* Val.: 1000, 100, 50, 25, dan

12,5 µg/ml, kemudian diinkubasikan lagi pada 37°C dalam inkubator CO₂ selama 24 jam. Setelah inkubasi media diambil dan kultur dicuci dua kali dengan larutan PBS, kemudian ditambah 100 µl larutan MTT 0,5 mg/ml dan diinkubasi kembali selama 4 jam. Terakhir ditambahkan larutan SDS 10% pada masing-masing sumuran untuk melarutkan kristal formazan yang terbentuk serta plat diinkubasi dalam ruang gelap selama semalam. Warna ungu yang terbentuk diukur absorbansinya dengan ELISA *reader* pada 595 nm. Warna ungu mengindikasikan adanya sel hidup, makin gelap warna ungu makin banyak sel yang hidup.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian dilaksanakan di *greenhouse* milik Pusat Inovasi Agroteknologi Terpadu (PIAT) Universitas Gadjah Mada di Kalitirto Berbah Sleman. Waktu pelaksanaan awal Januari-Oktober 2019. Pemupukan dilakukan menggunakan nitrogen (N) organik dari kompos daun-daun legume, fosfor (P) organik dari pupuk SP36, Kalium (K) dari KCl dan kombinasi pupuk NPK (Gambar 1).

Hasil pengamatan perkembangan tanaman *C. mangga* Val., suhu dan kelembaban di dalam dan luar *greenhouse*, efek induksi serta hasil panen rimpang (Gambar 2), dapat diuraikan sebagai berikut. Penanaman dalam pot tampaknya tidak cocok



untuk pertumbuhan *C. mangga* Val. karena pada umumnya tanaman tersebut tumbuh liar di kebun; selain juga dalam pot dosis pemupukan menjadi terlalu tinggi, utamanya pupuk Kalium sehingga kelompok K dan kombinasi NPK tidak tumbuh bagus dan bahkan mati saat tanaman menjelang umur 6 bulan (Gambar 2M & 2N). Akibatnya pada akhir percobaan kelompok K dan Kombinasi NPK tidak dapat dipanen (Gambar 2R & 2S). Oleh karena itu, pemanenan rimpang hanya dilakukan pada kelompok Kontrol (tanpa

pupuk), N dan P (Gambar 2.5 & 2.6) setelah tanaman memasuki masa dorman (warna daun menguning kecoklatan dan rebah ke tanah), yaitu saat tanaman berumur 7 bulan (Gambar 2P, 2Q, dan 2T).

Induksi yang terjadi pada tanaman ternyata tidak hanya karena penghentian pemberian air, tetapi juga karena kondisi suhu lingkungan yang terlalu panas karena cuaca panas di pulau Jawa yang maju dan terlalu tinggi. Pada akhir Februari 2019 (tanaman berumur 1 bulan) suhu *greenhouse* mencapai

Gambar 2. Pengamatan Tanaman *C. Mangga Val.* selama Pemupukan, Induksi, dan Panen



Keterangan:

1. Pot penanaman dan pemupukan tanaman *C. mangga Val.* dalam *Greenhouse* (panah biru).
A-E: Tunas kelompok N organik, P organik, K anorganik, Kombinasi NPK dan Kontrol.
F-J: Kelompok N, P, K, Kombinasi NPK dan Kontrol, umur 3 bulan.
K-O: Kelompok N, P, K, Kombinasi NPK dan Kontrol, umur 6,5 bulan.
P-T: Kelompok N, P, K, Kombinasi NPK dan Kontrol, umur 7 bulan.
2. Suhu *Greenhouse* pagi hari 34,2°C dan kelembaban 56%, saat tanaman umur 1 bulan.
3. Suhu *Greenhouse* siang hari 37,3°C dan kelembaban 49%, saat tanaman umur 1 bulan.
4. Suhu di luar *Greenhouse* siang hari 38,0°C, kelembaban 44%, saat tanaman umur 3 bulan.
5. Hasil panen kelompok N pada saat tanaman umur 7 bulan
6. Hasil panen kelompok P pada saat tanaman umur 7 bulan.

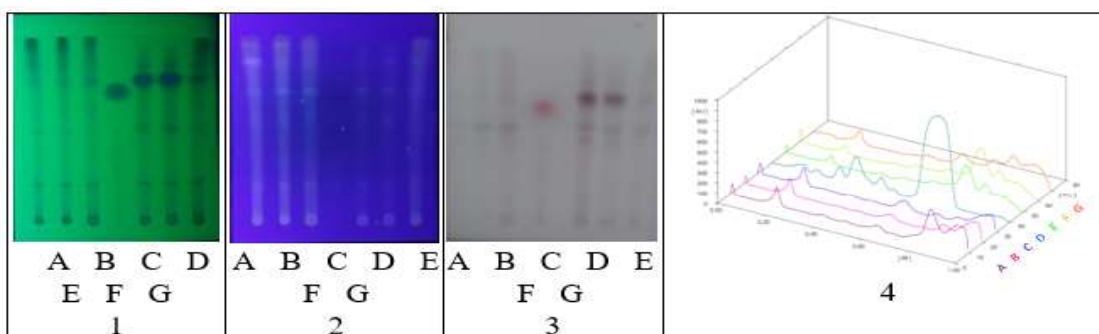
34,2°C dengan kelembaban air 56% di pagi hari dan 37,3°C dengan kelembaban 49% di siang hari sehingga diperlukan 3 kipas angin besar agar dapat mengurangi panas udara *greenhouse* (Gambar 2.2 dan 2.3). Penempatan kipas angin ini ternyata tidak mengurangi suhu dalam *greenhouse*, yang pada siang hari 38,0°C dengan kelembaban 44% disaat tanaman berumur 3 bulan (Gambar 2.4). Sehingga pot dipindah keluar *greenhouse* dan ditempatkan di bawah naungan pepohonan (Gambar 2K-2T). Meski suhu panas tersebut menyebabkan tanaman tidak tumbuh dengan baik (Gambar 2F-2T), tetapi ternyata memperkuat induksi pada tanaman sehingga masa dorman semua kelompok tanaman menjadi maju, dari yang seharusnya yaitu pada umur 9-10 bulan menjadi pada umur 7 bulan (Gambar 2P, 2Q, dan 2T).

Ekstraksi dan penetapan kadar minyak.

Ekstraksi dilakukan pada rimpang hasil panen pertama dan kedua dari 3 kelompok perlakuan, yaitu: kelompok N, P, dan Kontrol (Gambar 2K, 2L, 2O, 2P, 2Q, 2T); kelompok K dan NPK tidak ada hasilnya karena tanaman mati (Gambar 2R dan 2S). Rimpang kelompok N, P dan Kontrol dimaserasi dengan n-Heksan dan kemudian pelarut diuapkan. Ekstrak kental yang dihasilkan digunakan untuk penetapan kadar minyak *C. mangga* Val. melalui perbandingan densitas spot KLT sampel terhadap spot minyak eugenol yang diketahui kadarnya dengan Densitometer (Gambar 3.1, 3.2, 3.3, 3.4). Ekstrak kental juga untuk uji sitotoksisitas kandungan zat aktif minyak (Gambar 4).

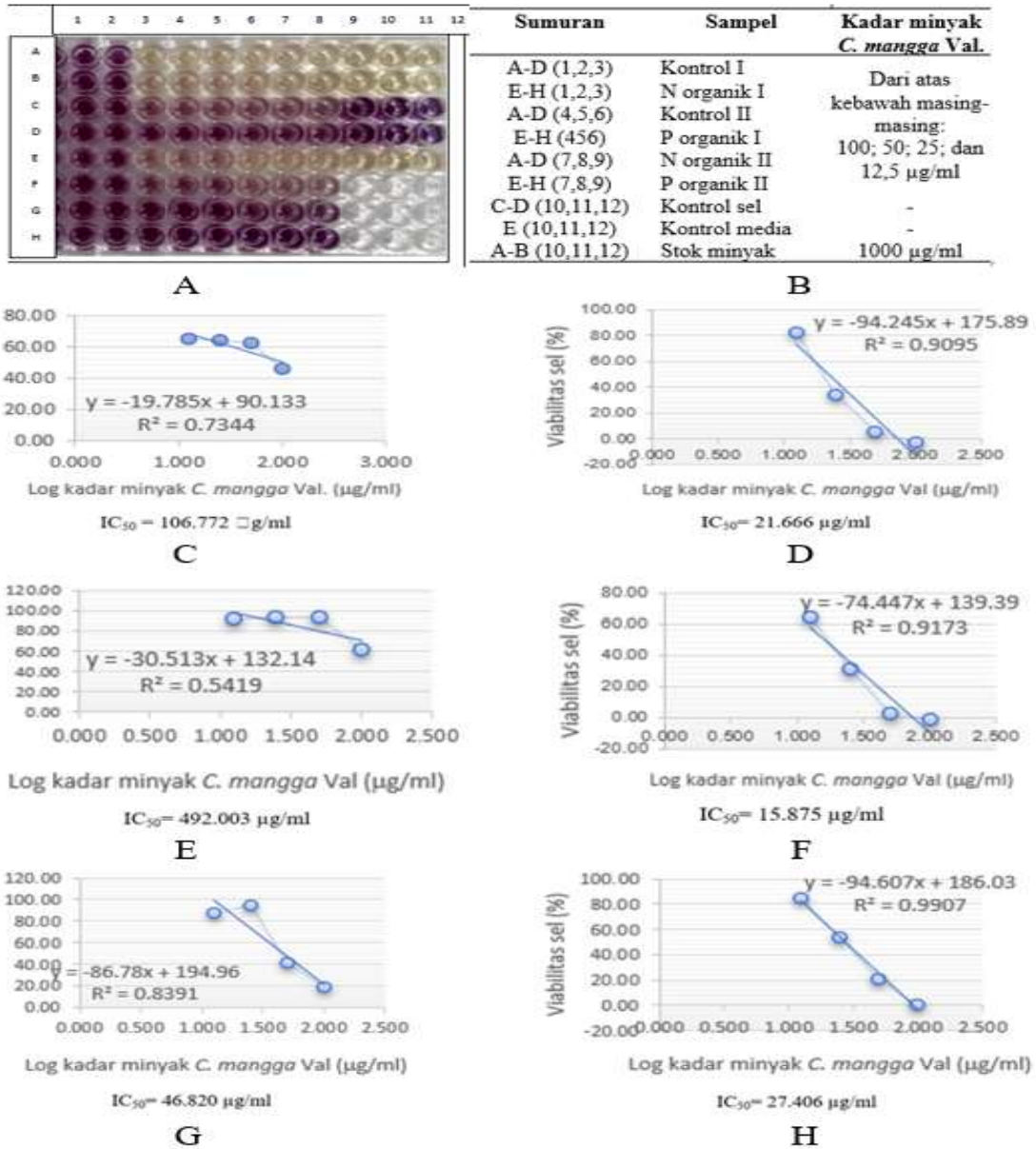
Dari densito-kromatogram (Gambar 3.4) terlihat bahwa pemanenan rimpang pertama

Gambar 3. Hasil KLT Ekstrak Minyak *C. Mangga* Val.



Keterangan: Fase diam Silika $G_{60}F_{254}$ dan fase gerak n-Heksan:Etil-asetat (7:3). Deteksi spot dengan penyinaran (1) UV 254, (2) UV 366, (3) Penyemprotan pereaksi anisaldehyd-asam sulfat, kemudian dipanaskan, dan (4) Penetapan kadar dengan densitometer: (A) Sampel Kontrol I, (B) Sampel N organik I, (C) Sampel P organik I, (D) Pembanding Eugenol, (E) Sampel Kontrol II, (F) Sampel N organik II, (G) Sampel P organik II.

Gambar 4. Hasil Uji Sitotoksitas Minyak Atsiri *C. mangga* Val. terhadap Sel Kanker Payudara T47D



Keterangan: A. Uji *in vitro* sitotoksitas minyak pada sel T47D; B. Data uji sitotoksitas minyak *C. mangga* Val. secara *in vitro*; C-H adalah kurva regresi viabilitas sel T47D (%) vs log kadar minyak *C. mangga* Val. (µg/ml) dan IC_{50} dari sampel ekstrak minyak berturut-turut: K-I, K-II, N-I, N-II, P-I, dan P-II.

(umur 6,5 bulan) tanaman belum memasuki masa dorman secara sempurna sehingga

produksi minyak belum maksimal, baik pada kelompok Kontrol, N maupun P. Hal

tersebut terlihat pada rendahnya *spot density* minyak dari semua sampel I (Gambar 3.4A, 3.4B, 3.4C); yang kemudian meningkat pada semua sampel II (Gambar 3.4E, 3.4F, 3.4G) saat tanaman umur 7 bulan. Kromatogram juga menunjukkan bahwa pada umur 6,5 bulan (sampel I), kelompok pemupukan N lebih dahulu terjadi peningkatan produksi minyak dibandingkan kelompok P (meski masih lebih rendah daripada Kontrol); akan tetapi pada tanaman umur 7 bulan kelompok P memproduksi minyak lebih banyak daripada kelompok N dan Kontrol (Gambar 3.4). Meski produksi minyak pada semua sampel I belum optimal, akan tetapi induksi tanaman telah terjadi (baik karena penghentian pemberian air dan cuaca panas yang panjang dan maju); sehingga masa dorman tanaman maju dari umur 9-10 bulan menjadi pada umur 6,5-7 bulan (terbukti dengan terbentuknya minyak pada masa itu) (Gambar 3.4).

Uji sitotoksik zat aktif pada sel T47D. Dari hasil uji sitotoksisitas semua ekstrak

kental sampel (K-I dan II, N-I dan II, serta P-I dan II) pada sel kanker payudara T47D didapatkan kurva regresi viabilitas sel T47D (%) versus log kadar minyak atsiri *C. mangga Val.* ($\mu\text{g/ml}$), beserta IC_{50} -nya (Gambar 4). Sesuai dengan hasil penetapan kandungan minyak secara densitometri (Gambar 3), hasil uji sitotoksik ekstrak minyak.

Gambar 4 juga menunjukkan bahwa panen rimpang pertama (Sampel K-I, N-I, dan P-I) menunjukkan potensi sitotoksik yang lebih rendah daripada panen kedua (Sampel K-II, N-II dan P-II) selain juga tampak bahwa produksi minyak dalam sampel panen pertama belum stabil dan maksimal ($R^2 < 0,8$) dibanding sampel panen kedua ($R^2 > 0,9$) (Gambar 4).

Perbandingan IC_{50} dan R^2 regresi hasil uji sitotoksisitas terhadap hasil penetapan kandungan minyak secara densitometri menunjukkan hasil yang sejalan atau sinkron (Tabel 1). Terlihat bahwa pada panen pertama tanaman belum memproduksi minyak dengan

Tabel 1
Perbandingan IC_{50} dan R^2 Hasil Uji Sitotoksisitas terhadap Kandungan Minyak C, Mangga Val,

Sampel	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	R^2 Regresi	Bobot Minyak/ Sampel (mg/g)
Kontrol - I	106,772	0,7344	14,71
N organik - I	492,003	0,5419	4,23
P organik - I	46,820	0,8391	4,99
Kontrol - II	21,666	0,9095	14,78
N organik - II	15,875	0,9173	19,07
P organik - II	27,406	0,9907	14,55

maksimal, yang terlihat sebagai IC₅₀ yang tinggi, R² regresi dan kandungan minyak yang rendah (Tabel 1). Berdasarkan data Tabel 1 dapat disimpulkan bahwa pemupukan N organik pada *C. mangga Val.* mampu meningkatkan produksi dan sitotoksisitas minyak terhadap sel kanker payudara T47D (IC₅₀=15,875 µg/ml) dibandingkan dengan minyak atsiri dari tanaman Kontrol (IC₅₀=106,772 mg/ml). Penghentian pemberian air menjelang masa dorman dan suhu lingkungan yang panas (>37°C) mampu menginduksi majunya masa dorman tanaman *C. mangga Val.*

SIMPULAN

Pemupukan N organik pada *C. mangga Val.* mampu meningkatkan produksi minyak dalam rimpang dan sitotoksisitas minyak terhadap sel kanker payudara T47D. Penghentian pemberian air menjelang masa dorman dan suhu lingkungan yang panas (>37°C) mampu menginduksi majunya masa dorman pada tanaman *C. mangga Val.*

DAFTAR PUSTAKA

- Astuti, E., Sudiby, R. S., Jenie, U. A., Mubarika, S., & Sismindari. (2015). Impact of curcuma mangga Val. rhizome essential oil to p53, Bcl-2, H-ras and caspase-9 expression of myeloma cell lines. *Indonesian J Biotech*, 19(1), 23-32.
- Astuti, E. (2014). *Mekanisme molekuler antikanker senyawa aktif dalam rimpang curcuma mangga Val.* (Disertasi tidak diterbitkan). Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
- Budiman, H. (2001). *Uji Sitotoksisitas Kandungan Metabolit Sekunder Rimpang C. mangga Val. pada Sel HeLa-S3 dan Raji Serta Identifikasi Struktur Kimianya.* Thesis. Program Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Khasanah, N. (2002). *Analisis GC-MS dan uji sitotoksisitas ekstrak minyak atsiri rimpang curcuma mangga Val. pada HeLa-S3 dan raji cell line* (Thesis tidak diterbitkan). Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Lestariana, W., Triandiyasih, H., Sismindari, & Mubarika, S. (2000). *Identifikasi Protein Aktif dalam Curcuma mangga dan Uji Aktivitasnya pada DNA Superkoil.* *Buletin ISF*, Vol.3, 25-30.
- Nurrokhman. (2004) *Efek antiproliferasi dan induksi apoptosis minyak atsiri C. mangga Val. pada epithelial cervical cancer cell lines* (HeLa dan Siha) (Thesis tidak diterbitkan). Program Pasca Sarjana, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Rumiyati, Sudiby, R. S., Sismindari, Jenie, U. A., Mubarika, S., & Kardono, L. B. (2007). Selective cytotoxicity of essential oil of *C. mangga Val.* on cell lines and its effect on expressions of p53 and Bcl-2. *Proceeding of The International Symposium on Recent Progress in Curcumin Research* (pp. 107-114). Faculty of Pharmacy, Gadjah Mada University, Indonesia,
- Sismindari, Sudiby, R., & Astuti, E. (2004). Cytotoxic effects of protein fraction isolated from curcuma mangga Val rhizomes and containing ribosome-inactivating proteins on cancer cell-lines and normal cell. *Indonesian Journal of Chemistry*, 4(3), 206-111.

- Wahyuningsih, M. S. H., Mubarika, S., Bolhuis, R. L. H., Nooter, K., & Oostrum, R. G. (2003). Sitotoksitas rimpang temu mangga (*Curcuma Mangga Val. & V. Zijp.*) dan kunir putih (*Curcuma Zedoria i.*) terhadap beberapa sel kanker manusia (in vitro) dengan metoda SRB. *Journal of the Medical Sciences (Berkala ilmu Kedokteran)*, 35(4), 197-200.
- Song, D., Cui, M., Zhao, G., Fan, Z., Nolan, K., Yang, Y., ... & Zhang, D. Y. (2014). Pathway-based analysis of breast cancer. *American journal of translational research*, 6(3), 302.
- Sudibyoy, R. S., & Purnomo, H. (2019, September). *Molecular docking compounds of essential oil isolated from curcuma mangga Val. toward EGFR*. Makalah dipresentasikan pada Science and Science Education International Seminar. Universitas Negeri Yogyakarta, Yogyakarta.
- Sudibyoy, R. S. (2000). Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of the main content of volatile oil isolated from *Curcuma mangga*. *BMIPA*, 10(2), 55-6.