

Uji Efikasi Ekstrak Metanol Daun Torbangun (*Plectranthus amboinicus*) pada Sel Epitel Kelenjar Susu Manusia MCF-12A (Efficacy Methanol Extract of Torbangun Leaves (*Plectranthus amboinicus*) in Epithelial Cell of Mammary Gland MCF-12A)

FITRY TAFZI^{1*}, NURI ANDARWULAN^{2,3}, PUSPO EDI GIRIWONOB^{2,3}, FITRIYA NUR ANISA DEWID⁴

¹Program Studi Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jambi, Jl. Tri Brata, Pondok Meja KM 11, Jambi, 36364.

²Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga 16680, Bogor.

³Southeast Asian Food and Agricultural Science and Technology (SEAFST) Center, LPPM-Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga 16680, Bogor.

⁴Pusat Studi Satwa Primata, Institut Pertanian Bogor, Jl. Lodaya II/5 Bogor.

Diterima 3 November 2016 , Disetujui 20 Januari 2017

Abstrak: Daun torbangun adalah tanaman herba yang banyak tumbuh di daerah tropis. Daun torbangun dapat meningkatkan air susu ibu (ASI) dan mempunyai aktivitas antioksidan, sehingga berpotensi dikembangkan sebagai pangan fungsional untuk ibu hamil dan menyusui. Tujuan penelitian ini adalah untuk melihat komponen fitokimia, aktivitas antioksidan, uji sitotoksitas dan perubahan ekspresi gen laktasi pada sel epitel kelenjar susu yang diberi ekstrak metanol daun torbangun. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun torbangun berpotensi sebagai antioksidan dan mampu menangkap radikal bebas DPPH dengan nilai EC_{50} 14,14 $\mu\text{g/mL}$. Pada konsentrasi rendah ekstrak metanol tidak bersifat toksik terhadap sel epitel kelenjar susu manusia MCF 12-A dengan nilai IC_{50} 155,24 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrak metanol daun torbangun meningkatkan ekspresi gen prolaktin reseptor dan glukokortikoid reseptor pada sel epitel kelenjar susu manusia MCF-12A yang berperan dalam laktasi.

Kata kunci: daun torbangun, prolaktin, glukokortikoid, laktasi.

Abstract: Torbangun (*Plectranthus amboinicus*) is an herbaceous plant that grows in the tropical region. Torbangun can increase breast milk and has antioxidant activity. The objective of this research was to evaluate the antioxidant and cytotoxic activities of methanol extract of torbangun leaves and to identify differentially expressed lactation genes upon incubation of MCF-12A human cell epithelial mammary gland with methanolic extract of torbangun leaves. The results showed that the methanolic extract of torbangun leaves had a scavenging activity of DPPH radical with EC_{50} value of 14.14 $\mu\text{g/mL}$. At lower concentration of methanol extracts of torbangun leaves showed no potent cytotoxic effect on MCF-12A with IC_{50} value of 155.24 $\mu\text{g/mL}$. The methanolic extract of torbangun leaves increased genes expression of prolactin receptor and glucocorticoid receptor in human mammary gland epithelial cells MCF-12A.

Keywords: torbangun leaves, glucocorticoid, prolactin, lactation.

* Penulis korespondensi, Hp. 08127866932
e-mail: fitry_tafzi@yahoo.com

PENDAHULUAN

TORBANGUN (*Plectranthus amboinicus*) adalah tanaman herba yang banyak tumbuh di daerah tropis sampai subtropis. Torbangun termasuk dalam *famili Labiatae*. Tanaman ini dapat dijumpai hampir diseluruh wilayah Indonesia dengan berbagai nama. Di daerah Sumatera, torbangun dikenal dengan nama bangun-bangun, daun jinten (Jawa), ajeran (Sunda), majhanereng (Madura), iwak (Bali), golong (Flores), dan kumuetu (Timor)⁽¹⁾. Torbangun banyak digunakan sebagai obat tradisional antara lain untuk obat batuk, lambung, mual, muntah, penyembuh luka, sariawan dan sebagainya. Bagian torbangun yang banyak digunakan untuk obat adalah daun. Khusus pada masyarakat Batak daun torbangun dikonsumsi secara turun temurun untuk meningkatkan air susu ibu (ASI). Konsumsi sayur daun torbangun 150 g setiap dua hari meningkatkan ASI sampai 65%⁽²⁾.

Selain sebagai pangan untuk meningkatkan ASI bagi ibu hamil dan menyusui, daun torbangun juga bisa digunakan sebagai sumber antioksidan⁽³⁾. Selama kehamilan terjadi perubahan fisiologis yang menghasilkan radikal bebas⁽⁴⁾, dibutuhkan antioksidan untuk mengatasinya. Disamping itu ASI juga mengandung antioksidan yang dibutuhkan oleh bayi. Kandungan antioksidan pada ASI tertinggi pada kolustrum, kemudian jumlahnya akan berkurang selama proses menyusui. Peningkatan kandungan antioksidan pada ASI dapat dilakukan dengan meningkatkan konsumsi pangan yang mengandung antioksidan⁽⁵⁾.

Komponen bioaktif dalam daun torbangun dapat berfungsi sebagai antioksidan, sekaligus untuk meningkatkan ASI, sehingga daun torbangun berpotensi untuk dikembangkan sebagai pangan fungsional yang dapat meningkatkan ASI dan sumber antioksidan bagi ibu hamil dan menyusui. Dalam pengembangan daun torbangun sebagai pangan fungsional untuk ibu hamil dan menyusui perlu diketahui secara ilmiah komponen fitokimia yang dikandung, keamanan dan aktivitas biologi yang berhubungan dengan antioksidan dan laktasi.

Penelitian ini bertujuan untuk melihat komponen fitokimia, aktivitas antioksidan, uji sitotoksitas dan perubahan ekspresi gen reseptor hormon laktasi pada sel epitel kelenjar susu manusia yang diberi ekstrak metanol daun torbangun.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Daun torbangun (Bogor, Indonesia), metanol 80%, gas nitrogen, NH₃, CHCl₃, H₂SO₄, reagen *dragendrof*, *mayer* dan *wagner*, *aquadest*,

amil alkohol, etanol, FeCl₃, CH₃COOH, NaOH, dietil eter, larutan Folin-Ciocalteu, AlCl₃, helium, DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), sel line MCF-12A (ATCC CRL-10782), larutan MTT (Sigma), media tumbuh MEGM (Lonza), tripsin, RPMI (Lonza),

Alat: *freeze dryer*, pengayak, sonikator (Branson), *shaker*, *sentrifuge*, kertas saring Whatman no 42, pompa vakum, *rotary evaporator* (Buchi), *Water bath*, spektrofotometer UV-Vis, kromatografi gas pirolisis (Shimadzu GC-MS QP 2010), inkubator, PBS (Sigma), ELISA *reader*, kit komersial (Rneasy mini kit, Qiagen), *nanodrop* 2000 spektrofotometer (Thermo Scientific), mesin qRT-PCR (Biorad), alat gelas.

METODE. Daun Torbangun. Daun torbangun berasal dari Kebun Percobaan Leuwikopo IPB Dramaga Bogor. Bagian yang dipanen adalah daun dan sebagian batang yang tumbuh sekitar 10-20 cm dari pucuk. Daun diidentifikasi oleh ahli taksonomi dari Pusat Penelitian Biologi Lembaga Penelitian Indonesia (LIPI). Setelah dipanen, daun torbangun disimpan pada suhu -20 °C selama 24 jam, kemudian dikeringkan dengan pengering beku selama 48 jam. Selanjutnya dihancurkan menjadi bubuk dengan blender dan diayak, sehingga didapat bubuk daun torbangun. Bubuk daun torbangun disimpan dalam suhu -20 °C ditempat gelap sampai dilakukan ekstraksi.

Ekstraksi Bubuk Daun Torbangun. Ekstraksi bubuk daun torbangun dilakukan dengan cara sonikasi. Bubuk daun torbangun ditambah metanol 80% dengan perbandingan 1:20. Kemudian diaduk dengan *shaker* selama 20 menit dengan kecepatan 125 rpm. Setelah itu diekstraksi dengan sonikator (Branson) selama 50 menit, kemudian disentrifus dengan kecepatan 2.000 rpm selama 5 menit, setelah itu disaring dengan kertas whatman no 42 menggunakan pompa vakum. Ampas yang diperoleh diekstraksi kembali dengan metanol 80%, kemudian filtrat hasil ekstraksi digabungkan. Selanjutnya filtrat diuapkan dengan *rotary evaporator* (Buchi) pada suhu 40-50 °C sampai pekat. Setelah itu ekstrak dikeringkan dengan gas nitrogen, diperoleh ekstrak metanol daun torbangun. Ekstraksi daun torbangun diulang tiga kali.

Uji Fitokimia Secara Kualitatif. Pengujian fitokimia ekstrak metanol daun torbangun secara kualitatif menurut metode *Harborne*⁽⁶⁾. Pengujian dilakukan terhadap alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid, triterpenoid dan hidroquinon.

Uji Alkaloid. Ekstrak daun torbangun ditambahkan NH₃ beberapa tetes, kemudian dihaluskan. Selanjutnya ditambahkan 5 mL CHCl₃, setelah itu disaring dengan kertas saring. Filtrat yang dihasilkan ditambah dengan beberapa tetes H₂SO₄ 2 M, kemudian dibagi

menjadi tiga bagian. Masing-masing ditambah reagen *dragendrof*, *mayer* dan *wagner*. Jika terbentuk endapan berwarna jingga (*dragendrof*), putih (*mayer*), dan coklat (*wagner*) berarti ekstrak mengandung alkaloid.

Uji Flavonoid, Tanin dan Saponin. Ekstrak daun torbangun dilarutkan dengan *aquadest*, dipanaskan selama 5 menit, kemudian disaring dengan kertas saring. Filtrat dibagi tiga untuk uji flavonoid, tanin dan saponin. Filtrat pertama ditambah serbuk Mg, 10 tetes larutan HCl:etanol (1:1) dan 10 tetes amil alkohol. Jika lapisan amil alkohol berwarna jingga berarti terdapat flavonoid. Filtrat kedua ditambahkan 3 tetes FeCl₃. Jika warna larutan berubah menjadi hitam kehijauan berarti mengandung tanin. Filtrat ketiga dipanaskan selama 5 menit. Selanjutnya dikocok kuat. Jika terbentuk buih yang stabil berarti mengandung saponin.

Steroid dan Triterpenoid. Ekstrak daun torbangun dilarutkan dengan 5 mL etanol panas, kemudian disaring dengan kertas saring. Filtrat dipanaskan hingga kering, kemudian ditambahkan 1 mL dietil eter dan dihomogenisasi. Selanjutnya ditambahkan 1 tetes H₂SO₄ pekat dan 1 tetes CH₃COOH anhidrat. Jika warna larutan berubah menjadi warna hijau/biru berarti terdapat steroid, sedangkan jika berubah menjadi warna merah/ungu berarti mengandung triterpenoid.

Hidroquinon. Ekstrak daun torbangun dilarutkan dengan 5 mL metanol, kemudian dipanaskan, setelah itu disaring dengan kertas saring. Selanjutnya filtrat ditambah 3 tetes NaOH 10%. Jika warna larutan berubah menjadi merah berarti mengandung hidroquinon.

Total Fenol. Total Fenol dalam ekstrak daun torbangun diukur dengan metode kolometrik *Folin-Ciocalteu*. Sebanyak 200 µL larutan ekstrak metanol dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 1 mL larutan *Folin-Ciocalteu* 10% dan dibiarkan selama 1 menit, kemudian ditambahkan 3 mL Na₂CO₃ dan divortex. Selanjutnya disimpan dalam ruang gelap pada suhu ruang selama 2 jam. Kemudian diukur absorbannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 760 nm. Total fenol ditentukan berdasarkan kurva standar asam galat (Sigma) dan dinyatakan sebagai mg asam galat ekuivalen per gram ekstrak (mg AGE/g ekstrak)⁽⁷⁾.

Total Flavonoid. Total Flavonoid dalam ekstrak daun torbangun diukur dengan metode kolometrik. Sebanyak 500 µL larutan ekstrak metanol dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 100 µL AlCl₃ 10%, selanjutnya ditambahkan 100 µL CH₃COOK 1 M dan 4,3 mL *aquadest*. Setelah itu divortex dan disimpan pada suhu ruang selama

30 menit. Kemudian diukur absorbannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 415 nm. Total flavonoid ditentukan berdasarkan kurva standar quersetin (Sigma) dan dinyatakan sebagai mg quersetin ekuivalen per gram ekstrak (mg QE/g ekstrak)⁽⁸⁾.

Analisa Kromatografi Gas Ekstrak Metanol Daun Torbangun. Komponen *volatile* dalam ekstrak daun torbangun dianalisis dengan kromatografi gas pirolisis (Shimadzu GC-MS QP 2010). Kolom yang digunakan adalah *Capiler Type Phase Rtx-5MS* dengan panjang 60 m dan diameter 0,25 mm. Gas pembawa adalah helium dengan kecepatan alir adalah 0,85 mL/min. Kondisi operasional adalah suhu awal kolom 50 °C, split ratio 112,3, suhu SP 280 °C, MS *interface* 280 °C, sumber ion 200 °C dan suhu pirolisis 400 °C. Identifikasi komponen kimia dilakukan dengan membandingkan hasil spektra massa GC-MS dengan data *base* spektra massa pada pustaka *wiley*.

Aktivitas Antioksidan. Aktivitas antioksidan ekstrak metanol diukur dengan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) dan vitamin C digunakan sebagai kontrol positif. Ekstrak dilarutkan dalam etanol dengan berbagai konsentrasi yaitu 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; dan 3,125 µg/mL. Sebanyak 500 µL ekstrak ditambah dengan 500 µL DPPH 125 mM, dibiarkan pada suhu ruang dan gelap selama 30 menit. Kemudian absorban dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm. Kemampuan untuk menghambat DPPH (%) dihitung dengan rumus $(A-B)/A \times 100\%$. Dimana A adalah absorban kontrol (etanol dan DPPH), sedangkan B adalah absorban ekstrak metanol daun torbangun. Korelasi antara konsentrasi ekstrak metanol daun torbangun dan persen penghambatan DPPH *diplot* untuk mencari nilai EC₅₀. Nilai EC₅₀ menyatakan efektifitas konsentrasi ekstrak metanol daun torbangun yang dapat menangkap 50% radikal bebas DPPH⁽⁹⁾.

Uji Sitotoksitas. Uji sitotoksitas ekstrak metanol daun torbangun terhadap sel epitel kelenjar susu manusia dilakukan menggunakan sel *line* MCF-12A (ATCC CRL-10782). Pengujian dilakukan dengan metoda MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid). Ekstrak dilarutkan dalam media tumbuh MEGM (Lonza) dengan konsentrasi 10000 µg/mL. Kemudian dilakukan serangkaian pengenceran untuk mendapatkan larutan uji. Konsentrasi ekstrak yang akan diuji adalah 7,81; 15,63; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 dan 1000 µg/mL. Suspensi sel dalam media MEGM sebanyak 100 µL (kepadatan sel MCF-12A adalah 5×10^3) dimasukkan ke setiap sumuran dalam *well plate* 96. Kemudian *plate* diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37 °C dan CO₂ 5% selama 24 jam. Setelah itu media dibuang

dan digantikan dengan larutan ekstrak metanol daun torbangun sesuai dengan konsentrasi yang akan diuji dan diinkubasi dalam inkubator suhu 37 °C dan CO₂ 5% selama 48 jam. Selanjutnya media dibuang dan dilakukan pencucian dengan PBS (Sigma). Setelah itu ditambahkan 10 µL larutan MTT (Sigma) 5000 ppm pada setiap sumuran, kemudian diinkubasi dalam inkubator suhu 37 °C dan CO₂ 5% selama 4 jam.

Sel hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formazan yang berwarna ungu. Kemudian media dibuang dan ditambahkan 100 µL etanol 96% untuk melarutkan formazan. Setelah itu absorbannya dibaca dengan *ELISA Reader* pada panjang gelombang 595 nm. Persentase sel hidup dihitung dengan rumus $(A-C)/(B-C) * 100 \%$. Dimana A adalah absorbansi kontrol sel, B adalah absorbansi perlakuan ekstrak metanol dan C adalah absorbansi kontrol media. Korelasi antara log konsentrasi ekstrak metanol daun torbangun dan persen sel hidup digunakan untuk menghitung nilai IC₅₀ yang menyatakan potensi sitotoksitas dari ekstrak metanol daun torbangun⁽¹⁰⁾.

Ekspresi Gen Reseptor Hormon Laktasi. Sebanyak $3,9 \times 10^6$ sel MCF-12A (ATCC CRL-10782) ditumbuhkan dalam setiap sumuran dalam *well plate* 6. Kemudian diinkubasi dalam inkubator suhu 37 °C dan CO₂ 5% selama 24 jam. Setelah itu media dibuang dan diganti dengan media baru yang mengandung ekstrak metanol daun torbangun 25 ppm dan diinkubasi dalam inkubator suhu 37 °C dan CO₂ 5% selama 4 jam. Setelah itu media dibuang, dicuci dengan PBS. Selanjutnya ditambahkan 1,5 mL tripsin 0,25% dan diinkubasi dalam inkubator suhu 37 °C dan CO₂ 5% selama 15 menit. Kemudian ditambahkan 0,75 mL RPMI (Lonza) dan dimasukkan dalam vial dan disentrifuse dengan kecepatan 1.500 rpm selama 10 menit, supernatan dibuang. Setelah itu ditambahkan PBS 1 mL, kemudian disentrifuse dengan kecepatan 1500 rpm selama 10 menit, supernatannya dibuang dan dihasilkan *pellet* sel MCF-12A. Pellet disimpan pada suhu -20 °C sampai dilakukan ekstraksi mRNA.

Ekstraksi mRNA dari sel MCF-12A dilakukan dengan bantuan kit komersial (Rneasy mini kit, Qiagen). Pelaksanaan ekstraksi sesuai dengan prosedur yang telah ditetapkan produsen. Konsentrasi mRNA yang dihasilkan diukur dengan *nanodrop* 2000 spektrofotometer (Thermo Scientific) pada panjang gelombang 260 dan 280 nm.

Ekspresi gen reseptor hormon laktasi yang diamati adalah prolaktin reseptor (PrLR) dan glukokortikoid reseptor (GR) menggunakan mesin qRT-PCR (Biorad). Master mix qRT-PCR yang digunakan adalah *KAPA SYBR FAST Bio-Rad iCycler™ One-Step* qRT-PCR kit. Analisa RT-PCR dilakukan pada volume reaksi 20 µL yang terdiri dari primer *forward*

0,4 µL, primer *reverse* 0,4 µL, *dUTP KAPA* 0,4 µL, *SYBR FAST qPCR Master Mix* 10 µL, *KAPA RT Mix* 0,4 µL, *Nuklease Free Water* 3,4 µL dan mRNA 5 µL. Reaksi berlangsung pada kondisi: 42 °C, 5 menit untuk aktivasi *reverse transcriptase*, 95 °C, 5 menit untuk inaktivasi *reverse transcriptase*, kemudian reaksi diulang sebanyak 35 siklus pada 95 °C selama 5 detik (denaturasi) dan 55 °C selama 30 detik (*annealing*). Semua contoh dinormalisasi terhadap ekspresi gen *Glyceraldehyde-3 Phosphate Dehydrogenase* (GAPDH) dan dinyatakan sebagai *fold change*. Ekspresi gen relatif dihitung dengan metoda $-\Delta\Delta Ct$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Fitokimia, Total Fenol dan Flavonoid. Uji fitokimia secara kualitatif memberikan gambaran golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak. Ekstrak metanol daun torbangun mengandung tanin, saponin, steroid dan flavonoid, tetapi tidak mengandung alkaloid, triterpenoid dan quinon (Tabel 1). Hasil analisa fitokimia ini sama dengan penelitian Pillai⁽¹¹⁾ kecuali untuk alkaloid.

Kandungan fenolik dan flavonoid dari ekstrak metanol daun torbangun masing-masing adalah 265,83 mg AGE/g ekstrak dan 59,32 mg QE/g ekstrak (Tabel 1). Kandungan fenolik dan flavonoid yang dihasilkan dalam penelitian ini lebih tinggi dibandingkan dengan kandungan ekstrak etanol dan air daun torbangun hasil penelitian Wadekar⁽¹²⁾ yang masing-masing adalah 216 mg AGE/g ekstrak dan 35 mg QE/g ekstrak.

Perbedaan komponen fitokimia ini disebabkan oleh perbedaan tempat tumbuh torbangun dan metode ekstraksi yang dilakukan. Kandungan fenolik lebih tinggi jika diekstrak menggunakan metanol 80% dibandingkan dengan etanol 80%⁽¹³⁾. Ekstraksi komponen fenolik lebih baik dengan metode sonikasi dibandingkan dengan maserasi⁽⁷⁾.

Tabel 1. Komponen fitokimia ekstrak metanol daun torbangun.

No	Fitokimia	Hasil
1	Alkaloid	-
2	Flavonoid	+++
3	Tanin	+++
4	Saponin	+++
5	Steroid	+++
6	Triterpenoid	-
7	Hidroquinon	-
8	Total flavonoid	265,83±19,4 mg AGE/ g ekstrak
9	Total fenolik	59±3,4 mg QE/ g ekstrak

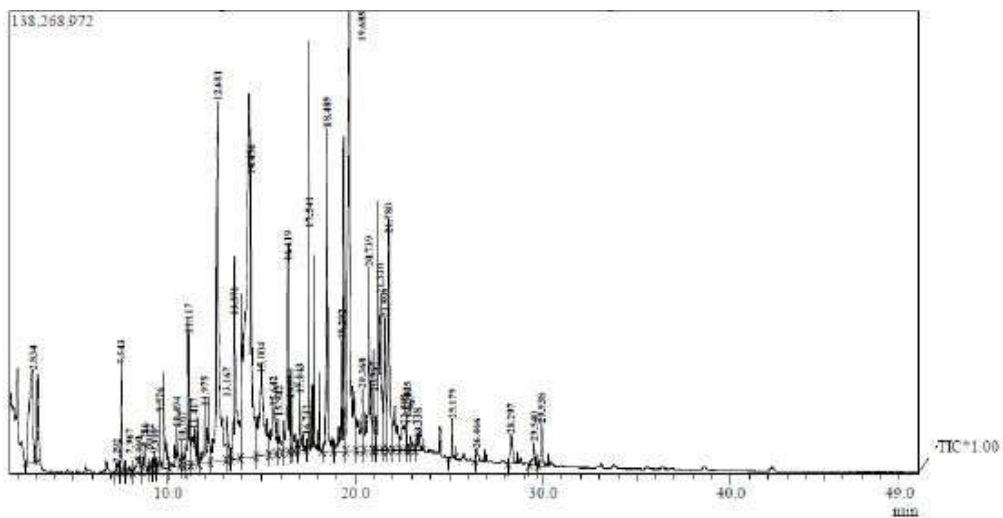
Ket: += ada, -= tidak ada

Analisa Komponen Volatil Ekstrak Metanol Daun Torbangun. Hasil analisa GC-MS pirolisis ekstrak metanol didapat 45 *peak* (Gambar 1). Hasil identifikasi spektra massa setiap *peak* dengan membandingkan spektra massa pada data *base* spektra massa *wiley* dapat diidentifikasi 10 jenis senyawa (Tabel 2). Senyawa *phytol*, asam palmitat, 9,12,15-octadecatrien-1-ol, asam linolenat dan α -tokoferol yang ditemukan ekstrak metanol daun torbangun, juga ditemukan pada komponen *volatile* ekstrak etanol daun torbangun hasil penelitian Uma⁽¹⁴⁾. Perbedaan komponen *volatile* dalam ekstrak yang dihasilkan diduga karena perbedaan iklim dan tempat tumbuh tanaman torbangun. Iklim pada saat pertumbuhan akan mempengaruhi kandungan minyak atsiri dan komposisi kimia dari tanaman torbangun⁽¹⁵⁾.

Aktivitas Antioksidan. Aktivitas antioksidan

Tabel 2. Hasil analisa GCMS ekstrak metanol daun torbangun.

No	Retention Time	Peak Area (%)	Formula Molekul	Berat Molekul	Senyawa
1	2.833	4,26	C ₄ H ₈ O ₂	60	Asam asetat
2	7.292	0,22	C ₈ H ₁₀	106	m-xylol
3	7.542	1,19			
4	7.967	0,10			
5	8.458	0,44			
6	8.783	0,49			
7	9.075	0,14			
8	9.368	0,22			
9	9.575	1,68			
10	10.042	0,86	C ₁₀ H ₁₆ O	150	chrysanthenone
11	10.767	0,33			
12	11.117	1,74	C ₈ H ₈ O ₂	124	mequinol
13	11.417	1,29			
14	11.975	1,62			
15	12.863	9,04			
16	13.167	0,73			
17	13.567	4,04			
18	14.458	17,70			
19	15.008	4,17			
20	15.642	1,91			
21	15.942	0,55			
22	16.417	2,95			
23	16.558	1,10			
24	16.742	0,30			
25	17.042	0,81			
26	17.542	1,82	C ₂₀ H ₄₀ O	296	phytol
27	18.492	4,37	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	Asam palmitat
28	19.202	3,28	C ₁₈ H ₃₄ O	264	0,12,15-octadecatrien-1-ol
29	19.683	9,75	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	292	Asam linolenat
30	20.367	1,59			
31	20.742	3,48			
32	20.967	1,06			
33	21.333	4,88			
34	21.600	2,44			
35	21.783	4,90			
36	22.108	1,27			
37	22.592	1,02			
38	22.742	0,32			
39	22.967	0,27			
40	23.342	0,38			
41	25.175	0,38	C ₂₀ H ₄₀	324	11-n-decyltetacosane
42	26.467	0,26	C ₂₈ H ₅₆ O ₂	402	Delta-tocopherol
43	28.300	0,75			
44	29.542	0,45			
45	29.942	0,82	C ₂₈ H ₅₆ O	342	α -tocopherol



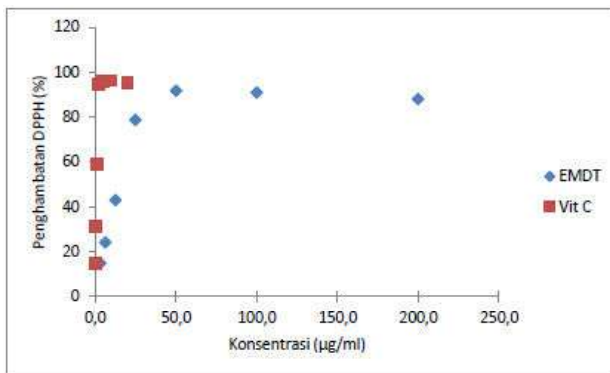
Gambar 1. Kromatogram GC-MS ekstrak metanol daun torbangun.

ekstrak daun torbangun diuji dengan metoda DPPH dan vitamin C digunakan sebagai kontrol positif. Kemampuan ekstrak daun torbangun dan vitamin C dalam menghambat radikal bebas DPPH disajikan pada Gambar 2. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak metanol daun torbangun semakin besar kemampuannya menangkap radikal bebas DPPH. Pada konsentrasi 25 $\mu\text{g/mL}$ ekstrak metanol daun torbangun dapat menangkap 78,88% radikal bebas DPPH dan pada konsentrasi 50 ppm 91,92%. Hasil ini masih dibawah aktivitas antioksidan Vitamin C, dimana pada konsentrasi 2,5 $\mu\text{g/mL}$ vitamin C mampu menangkap radikal bebas DPPH sebesar 94,49%.

Perbedaan ini disebabkan vitamin C merupakan senyawa murni, sedangkan ekstrak metanol masih merupakan ekstrak kasar yang mengandung berbagai jenis senyawa bioaktif. Nilai EC_{50} digunakan sebagai indikator untuk menunjukkan kemampuan ekstrak metanol daun torbangun dalam menghambat radikal bebas DPPH. Semakin rendah nilai EC_{50} semakin potensial sebagai antioksidan.

Nilai EC_{50} ekstrak metanol daun torbangun adalah 14,14 $\mu\text{g/mL}$, termasuk kepada golongan bahan dengan aktivitas antioksidan sangat kuat karena nilai EC_{50} kecil dari 50 $\mu\text{g/mL}$. Nilai EC_{50} yang dihasilkan lebih baik dibandingkan hasil penelitian Surya⁽¹⁶⁾ yaitu 90,96 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrak metanol daun torbangun berpotensi sebagai antioksidan karena adanya komponen fenolik, flavonoid dan α -tokoferol yang dikandungnya. Tanaman dengan kandungan fenolik yang tinggi menghasilkan aktifitas antioksidan yang kuat⁽¹⁷⁾.

Uji Sitotoksisitas. Uji sitotoksisitas dilakukan untuk konfirmasi bahwa sampai batas konsentrasi tertentu ekstrak metanol daun torbangun tidak menyebabkan apoptosis atau hambatan bagi pertumbuhan sel epitel kelenjar susu manusia. Pada penelitian ini digunakan sel *line* MCF-12A sebagai



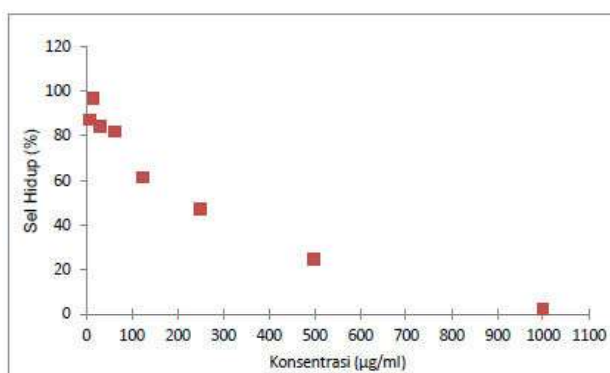
Gambar 2. Kemampuan menghambat radikal bebas DPPH dari ekstrak metanol daun torbangun (EMDT) dan vitamin C (Vit C).

model untuk sel epitel kelenjar susu manusia. Viabilitas sel MCF-12A yang diberi ekstrak metanol daun torbangun disajikan pada Gambar 3.

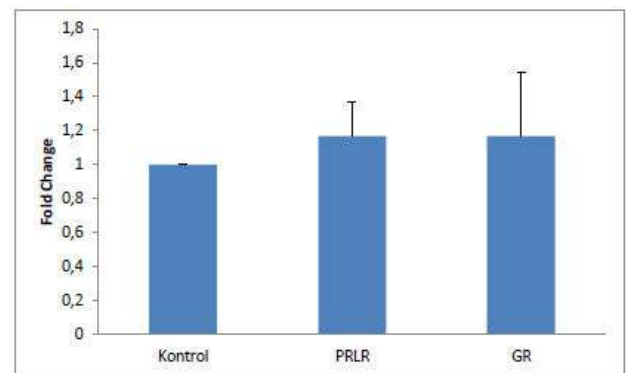
Semakin tinggi konsentrasi ekstrak metanol daun torbangun yang diberikan, maka viabilitas sel MCF-12A menurun. Pemberian ekstrak sampai konsentrasi 62,5 µg/mL jumlah sel MCF-12A yang hidup di atas 80%. Pemberian ekstrak konsentrasi 250 µg/mL jumlah sel MCF-12A yang hidup 47,03%, sedangkan pada konsentrasi 1000 µg/mL adalah 2,03%. Hal ini menunjukkan pemberian ekstrak metanol pada konsentrasi rendah viabilitas sel MCF-12A tidak terganggu.

Nilai IC_{50} ekstrak metanol daun torbangun adalah 155,24 µg/mL. Nilai IC_{50} menunjukkan konsentrasi ekstrak yang dapat mematikan sel MCF-12A sebesar 50%. Semakin rendah nilai IC_{50} semakin toksik suatu bahan. Nilai IC_{50} yang dihasilkan lebih besar dari 20 µg/mL. Menurut National Cancer Institute Amerika Serikat, ekstrak kasar dari tanaman bersifat toksik secara *in vitro* jika nilai IC_{50} kecil dari 20 µg/mL. Berdasarkan hal tersebut ekstrak metanol daun torbangun tidak toksik terhadap sel MCF-12A.

Nilai IC_{50} ekstrak metanol daun torbangun yang dihasilkan pada penelitian ini jauh lebih besar dibandingkan dengan nilai IC_{50} ekstrak etanol daun



Gambar 3. Pengaruh ekstrak metanol daun torbangun terhadap viabilitas sel MCF-12A.



Gambar 4. Ekspresi relatif gen prolaktin reseptor (PrlR) dan glukokortikoid reseptor (GR) yang diberi ekstrak metanol daun torbangun.

torbangun yang di uji terhadap sel kanker payudara MCF-7 yaitu 22,5 µg/mL dan sel kanker hati HEPG2 24,5 µg/mL⁽¹⁸⁾. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun torbangun lebih toksik terhadap sel kanker, dibandingkan terhadap sel normal. Ekstrak metanol *Piper cubeba* toksik terhadap sel kanker MCF-7 (IC_{50} 22,31 µg/mL), tetapi tidak toksik terhadap sel normal MCF-12A (IC_{50} >80 µg/mL)⁽¹⁹⁾.

Ekspresi Gen Reseptor Hormon Laktasi.

Prolaktin reseptor mempengaruhi proses laktasi, jika tidak ada prolaktin reseptor maka proses laktasi akan gagal⁽²⁰⁾. Ekspresi gen reseptor prolaktin pada kelenjar susu sapi meningkat pada awal periode laktasi dan menurun pada akhir periode laktasi⁽²¹⁾. Reseptor glukokortikoid dibutuhkan untuk proliferasi sel dan pembentukan *lobulo alveolar* selama laktasi. Kekurangan reseptor glukokortikoid akan mengakibatkan terganggunya pembentukan *lobulo alveolar* selama laktasi⁽²²⁾.

Pemberian ekstrak metanol daun torbangun pada sel MCF-12A sedikit meningkatkan ekspresi gen reseptor prolaktin 1,17±0,2 dan reseptor glukokortikoid 1,17±0,4 kali lipat dibandingkan dengan yang tidak diberi ekstrak (Gambar 4). Peningkatan ekspresi yang rendah ini disebabkan karena ekstrak metanol masih merupakan ekstrak kasar, yang terdiri dari berbagai macam senyawa dengan jumlah relatif kecil. Selain itu konsentrasi dan waktu inkubasi antara ekstrak metanol pada sel MCF-12A masih rendah (25 ppm) dan singkat (4 jam). Ekspresi prolaktin reseptor pada sel MCF-12A cenderung meningkat sedikit (dibawah 1,5) dengan pemberian hormon prolaktin⁽²³⁾.

Komponen fitokimia dalam ekstrak metanol daun torbangun menyebabkan terjadi perubahan ekspresi dari gen reseptor prolaktin dan reseptor glukokortikoid, sehingga mempengaruhi proses laktasi. Pada biji bunga rosela komponen fitokimia yang diduga meningkatkan ASI adalah saponin, tanin, alkaloid dan flavonoid⁽²⁴⁾, sedangkan pada tanaman

asparagus adalah steroidal saponin⁽²⁵⁾. Komponen flavonoid dalam daun torbangun adalah *quercetin*, *myricetin*, apigenin, luteolin dan kaemferol⁽²⁶⁾.

SIMPULAN

Ekstrak metanol daun torbangun mengandung fenolik, flavonoid, tanin, saponin dan steroid serta mampu menangkap radikal bebas DPPH dengan nilai EC₅₀ 14,14 µg/mL. Ekstrak metanol daun torbangun pada konsentrasi rendah tidak bersifat toksik pada sel epitel kelenjar susu manusia dengan nilai IC₅₀ 155,24 µg/mL. Pemberian ekstrak metanol daun torbangun pada sel epitel kelenjar susu manusia meningkatkan ekspresi gen reseptor prolaktin dan reseptor glukokortikoid yang berfungsi dalam proses laktasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Direktorat Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Kementerian Riset dan Pendidikan Tinggi yang telah membantu dana penelitian melalui hibah penelitian disertasi doktor.

DAFTAR PUSTAKA

- Dalimartha S. Atlas tumbuhan Indonesia Jilid 5. 2008. Puspa Swara. Jakarta.
- Damanik R, Wahlqvist ML, and Wattanapenpaiboon N. Lactagogue effects of Torbangun, a Batakese traditional cuisine. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2006.15(2): 267-74.
- Bhatt P and Negi PS. Antioxidant and antibacterial activities in the leaf extracts of indian borage (*Plectranthus amboinicus*). *Food Nutr Sci*. 2012.3:146-52. doi:10.4236/fns.2012.32022.
- Mistry HD dan Williams P. The importance of antioxidant micronutrients in pregnancy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2011. doi:10.1155/2011/841749
- Zarban A, Taheri F, Chahkandi T, Sharifzadeh G, Khorashadizadeh M. Antioxidant and radical scavenging activity of human colostrum traditional and mature milk. *J Clin Biochem Nutr*. 2009.45:150-4.
- Harborne JB. Metode fitokimia penuntun cara modern menganalisa tumbuhan. ITB Bandung. 1984.
- Majd MH, Rajaei A, Bashi DS, Mortazavi SA, Bolourian S. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from bovine pennyroyal (*Phlomischema parviflorum*) leaves using response surface methodology. *Ind Crops Prod*. 2014.57:195-202.
- Shah MD and Hossain MA. Total flavonoids content and biochemical screening of the leaves of tropical endemic medicinal plant *Merremia borneensis*. *Arab J Chem*. 2014.7:1034-8.
- Aranda RS, P´erez-L´opez LA, L´opez-Arroyo J, Alan´ıs-Garza BA, and Torres NW. Antimicrobial and antioxidant activities of plants from northeast of Mexico. 2011. doi:10.1093/ecam/nep127.
- Ayoub IM, El-Shazly M, Lu M-C, Singab ANB. Antimicrobial and cytotoxic activities of the crude extracts of *Dietes bicolor* leaves, flowers and rhizomes. *South African J Botany*. 2014.97:101.
- Pillai PG, Suresha P, Mishrab G, Annapurna M. Evaluation of the acute and sub acute toxicity of the methanolic leaf extract of *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng in balb C mice. *Eur J Exp Biol*. 2011.1(3):236-45.
- Wadekar RR, Wani NS, Bagul UB, Bagul SD, Bedmutha RK. Phytochemical investigation and screening of invitro anthelmintic activity of *Plectranthus amboinicus* leaves extracts. *Int J Pharmacognosy Phytochem Res*. 2010.3(2):35-8.
- Chavan UD, Amarowicz R. Effect of various solvent systems on extraction of phenolics, tannins and sugars from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.). *Int Food Res J*. 2013. 20(3):1139-44.
- Uma M, Jothinayaki S, Kumaravel S, Kalaiselv P. Determination of bioactive components of *Plectranthus amboinicus* Lour by GC-MS analysis. *N Y Sci J*. 2011.4(8):66-9.
- Khalid AK, El-Gohary AE. Effect of seasonal variations on essential oil production and composition of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) grow in Egypt. *Int Food Res J*. 2014.21(5):1859-62.
- Surya A, Jose C, Teruna HY. Studi aktivitas antioksidan dari ekstrak metanol dan etil asetat pada daun banggun-bangun (*Plectranthus amboinicus*). *J Ind Chem Acta*. 4. 2013.
- Wojdyło A, Oszmian´ski J, dan Czemerys R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem*. 2007.105:940-9.
- El-Hawary SS, El-sofany RH, Abdel-Monem AR, Ashour RS, Sleem AA. Polyphenolics content and biological activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng growing in Egypt (*Lamiaceae*). *Phcog J*. 2012.4(32):45-54.
- Graidist P, Martla M, Sukpondma Y. Cytotoxic activity of *Piper cubeba* extract in breast cancer cell lines. *Nutrient*. 2015.7: 2707-18. doi:10.3390/nu7042707.
- Morales FC, Hayashi Y, Pelt CS, Georgescu M-M. NHERF1/EBP50 controls lactation by establishing basal membrane polarity complexes with prolactin receptor. *Cell Death Dis*. 2012.3:391. doi:10.1038/cddis.2012.131.
- Yonekura S, Miyazaki S, Tokutake Y. Comparative expression profiling of lactogenic hormone receptor and it's signaling molecules of bovine mammary glands during lactation. *J Ani Sci*. 2015.5:106-113.
- Wintermantel TM, Bock D, Fleig V, Greiner EF, Schutz G. The epithelial glucocorticoid receptor is required for the normal timing of cell proliferation during mammary lobuloalveolar development but is dispensable for milk production. *Molecular Endocrinology*. 2005.19(2):340-9.

23. Chiba T, Kimura S, Takahashi K, Morimoto Y, Sanbe A, Ueda H, Kudo K. Serotonin suppresses β -casein expression via inhibition of the signal transducer and activator of transcription 5 (Stat5) protein phosphorylation in human mammary epithelial cells MCF-12A. *Biol Pharm Bull.* 2014.37(8):1336–40.
24. Okasha MAM, Abubakar MS, Bako IG. Study of the effect of aqueous *Hibiscus sabdariffa* Linn seed extract on serum prolactin level of lactating female Albino rats. *Eur J Sci Res.* 2008.22(4):575-83.
25. Gupta M, Shaw B. A double-blind randomized clinical trial for evaluation of galactagogue activity of *Asparagus racemosus* Willd. *Iranian J Pharm Res.* 2011.10(1):167-72.
26. Andarwulan N, Yuliana ND, Hasna E, Aziz SA, Davis TD. Comparative analysis of three torbangun clones (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng) based on phenotypic characteristics and phenolic content. *Am J Plant Sci.* 2014.5:3673-83. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2014.524383>.