

Pemakaian Sel HeLa dalam Uji Sitotoksitas Fraksi Kloroform dan Etanol Ekstrak Daun *Annona squamosa*

IRA DJAJANEGARA*, PRIO WAHYUDI

P3 Teknologi Bioindustri BPPT
Gedung II BPPT Lantai 13, Jl. M.H. Thamrin 8 Jakarta Pusat

Diterima 11 Juni 2008, Disetujui 28 Februari 2009

Abstract: Custard apple (*Annona squamosa*) is a favorite fruit in Indonesia. The leave of this plant is used and known for long time as an astringent, antiinflammatory, birth control, and antitumor agents. Previous experiments on toxicity using brine shrimp lethality test (BSLT) method indicated that the chloroform fraction of custard apple leaves was toxic to the shrimp larvae with LC_{50} value at $1.77\mu\text{g/ml}$. This experiment was carried out to investigate further the possible role of custard apple leaves as an anticancer agent using HeLa cell line. Experiment was initiated by extracting the leaves using 70% ethanol by means of maceration. The macerate was then fractionated further using chloroform as solvent. The ethanol fraction and chloroform fraction were used in cytotoxicity assay using (cervix cancer) HeLa cell line. Cytotoxicity assay was done using direct counting method. The amount of living cells were observed and counted, death percentage was then determined and probit analysis was applied to determine the LC_{50} value. LC_{50} value for ethanol fraction from the leaves of custard apple (*Annona squamosa*) was $7.695\mu\text{g/ml}$ while for chloroform fraction was $4.547\mu\text{g/ml}$ based on cytotoxicity analysis using HeLa cells. This experiment concluded that the leaves of custard apple (*Annona squamosa*) has cytotoxicity toward HeLa cell lines which confirmed the previous toxicity experiment using brine shrimp lethality test (BSLT) method. Overall, this experiment indicated that the leaves of custard apple (*Annona squamosa*) have anticancer activity.

Key words: leaf, custard apple (*Annona squamosa*), cytotoxicity, HeLa cell lines.

PENDAHULUAN

KANKER adalah penyakit akibat pertumbuhan tidak normal dari sel-sel jaringan tubuh yang berubah menjadi sel kanker. Dalam perkembangannya sel-sel kanker dapat menyebar ke bagian tubuh lainnya sehingga dapat menyebabkan kematian⁽¹⁾. Di antara penyebab kanker yang banyak dibuktikan saat ini adalah asap rokok. Para peneliti kanker menyimpulkan bahwa 70–90% kanker pada manusia dapat pula disebabkan oleh faktor-faktor lingkungan, termasuk makanan, konsumsi alkohol, polusi udara, air, bahan kimia di tempat kerja (misal: pabrik), radiasi dan sinar ultraviolet⁽²⁾.

Pengobatan penyakit kanker sering dilakukan dengan berbagai cara, antara lain operasi atau pembedahan, penyinaran atau radiasi, kemoterapi

serta yang sekarang berkembang adalah imunoterapi. Pengobatan ini ditujukan untuk membunuh sel-sel kanker sehingga tidak dapat berkembang dan membahayakan tubuh⁽³⁾. Salah satu masalah yang mempersulit upaya pengobatan kanker adalah kondisi ekonomis sebagian besar masyarakat yang belum memadai. Mengingat mahalnya biaya pengobatan, perlu dicari alternatif dengan memanfaatkan tumbuhan obat di sekitar kita atau istilah populernya, kembali ke alam (*back to nature*)⁽⁴⁾.

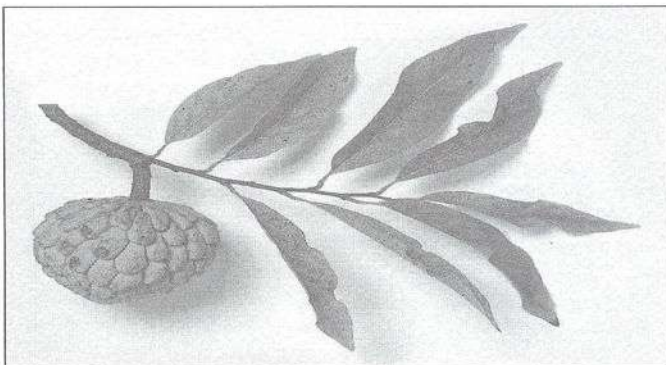
Pengobatan tradisional sering dilakukan masyarakat karena biayanya murah, bahannya mudah didapat dan aman bagi tubuh dan memiliki efek samping yang relatif lebih kecil dibandingkan dengan obat-obat modern⁽⁴⁾. Akhir-akhir ini banyak tanaman obat yang diteliti khasiatnya sebagai obat antikanker, salah satunya adalah srikaya (*Annona squamosa*) (Gambar 1). Tanaman ini mengandung beberapa senyawa aktif, antara lain flavonoid, borneol, kamphor, alkaloid, terpen, saponin, tanin,

* Penulis korespondensi, Hp. 08158845256
e-mail: idjajanegara@yahoo.com

polifenol dan senyawa poliketida. Menurut data empiris, daun srikaya dapat digunakan sebagai astringen, antiradang, antelmintik, antifertilitas, zat pemicu pematangan bisul dan antitumor^(5,6).

Data empiris ini didukung pula oleh penelitian sebelumnya tentang uji toksisitas beberapa tumbuhan obat di Indonesia, menggunakan uji kematian anak udang (larva *Artemia salina* Leach) yang dikenal luas dengan nama metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Dari hasil uji tersebut terlihat bahwa ekstrak kloroform daun srikaya pada dosis 10 µg/ml menunjukkan efek ketoksikan terhadap larva *Artemia salina* sebesar 98%, bahkan dengan penurunan dosis sampai 6 µg/ml masih menunjukkan efek toksisitas 98% dengan nilai *Lethal Concentration 50* (LC_{50}) 1,77 µg/ml. Dengan demikian, ekstrak kloroform dari daun srikaya dikatakan toksik karena mempunyai nilai $LC_{50} < 1000$ µg/ml⁽⁷⁾. Hasil uji pendahuluan ini mengindikasikan bahwa ekstrak daun srikaya juga akan bersifat toksik jika diujikan pada sel kanker sehingga berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai obat antikanker.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji lebih lanjut sitotoksitas daun srikaya terhadap sel kanker, yaitu sel HeLa. Sel HeLa merupakan salah satu sel kanker turunan dari sel epitel leher rahim (*cervix*) manusia. Dalam penelitian ini uji sitotoksitas dilakukan menggunakan metode penghitungan langsung (*viable cell count*) yang merupakan sistem penetapan in vitro untuk uji pendahuluan suatu bahan obat yang mengandung sejumlah besar zat aktif yang berpotensi sebagai obat antikanker. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tambahan bagi dunia farmasi sehingga tanaman srikaya dapat dimanfaatkan sebagai salah satu sumberdaya alam untuk alternatif pengobatan kanker dalam rangka pengembangan obat tradisional.



Gambar 1. Buah dan daun srikaya (*Annona squamosa*).

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia kering (dengan kadar air 25%) daun srikaya (*Annona squamosa*) yang telah dideterminasi di Herbarium Bogoriensis, Bogor. Beberapa bahan kimia yang dipakai untuk mengidentifikasi golongan kimianya (uji kandungan alkaloid, saponin, tanin, flavonoid, triterpenoid, sterol, dan glikosida) adalah asam hidroklorida, larutan Bouchardat, Dragendorff dan Mayer, natrium klorida, besi klorida, gelatin-asam klorida, petroleum benzene P, serbuk magnesium, pereaksi Lieberman Bourchard, etanol 96%, timbal asetat, kloroform P, isopropanol P, asam sulfat, dan asam asetat anhidrat. Bahan-bahan lain adalah media RPMI 1640, larutan PBS (*phosphate buffer saline*), larutan tripsin, larutan tripan biru, DMSO (dimetil sulfoksida) dan cisplatin (dalam bentuk bahan murni) sebagai kontrol positif karena merupakan salah satu obat antikanker golongan kompleks platinum.

METODE. Penelitian dimulai dengan mengidentifikasi golongan kimia dari senyawa-senyawa dalam daun srikaya^(8,9). Hal ini dilakukan untuk memastikan adanya kandungan alkaloid, saponin, tanin, flavonoid, glikosida, dan triterpen-steroid dalam daun srikaya yang akan dipakai pada penelitian ini. Langkah selanjutnya adalah mengekstraksi bahan aktif dari daun srikaya dengan etanol dan kloroform. Ekstraksi dengan etanol 70% dilakukan secara maserasi, yaitu dengan memasukkan 636 gr serbuk simplisia ke dalam botol bermulut lebar, kemudian ditambahkan etanol 70% sampai semua simplisia terendam. Setelah 3 hari perendaman dengan pengadukan berkala, campuran disaring dan terhadap ampas yang diperoleh dilakukan perendaman berkali-kali lagi hingga filtratnya tidak berwarna. Maserat yang diperoleh lalu dipartisi, kemudian sisanya dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan kecepatan 50 rpm dan dikeringkan di dalam oven pada suhu 40°C hingga diperoleh bobot tetap⁽¹⁰⁾.

Sebanyak 1 liter ekstrak etanol 70% yang belum diuapkan dipartisi dengan kloroform secara bertahap di mana terhadap 250 ml ekstrak cair ditambahkan 250 ml kloroform hingga volume menjadi 500 ml dan dikocok selama kurang lebih 15 menit. Setelah dibiarkan selama kurang lebih 5 menit, akan terbentuk 2 lapisan, yaitu etanol dan kloroform. Lapisan kloroform diambil dan diulangi lagi perlakuan seperti sebelumnya sebanyak 3 kali. Fraksi kloroform kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan kecepatan 50 rpm hingga kental tetapi masih dapat dituang. Fraksi ini lalu dikeringkan di dalam oven pada suhu 40°C hingga diperoleh bobot tetap⁽¹⁰⁾. Baik terhadap

fraksi etanol 70% maupun fraksi kloroform, kemudian dihitung rendemen dan bobot jenisnya. Kedua fraksi tersebut di atas juga dihitung susut pengeringannya sesuai cara yang tercantum dalam *Materia Medika Indonesia*⁽¹¹⁾.

Pembuatan larutan uji ekstrak etanol 70% dan kloroform daun srikaya (*Annona squamosa*) dilakukan dengan mengambil masing-masing ekstrak kering sebanyak 50 mg untuk dilarutkan dengan 0,25% DMSO sehingga diperoleh konsentrasi 625 µg/ml. Dari larutan induk tersebut dibuat pengenceran dengan konsentrasi 156,25; 78,12; 39,06; 19,53; 9,76; dan 4,88 µg/ml untuk ekstrak etanol 70%. Sementara itu, untuk ekstrak kloroform, dari larutan induk dibuat konsentrasi 78,12; 39,06; 19,53; 9,76; 4,88; dan 2,44 µg/ml. Cisplatin, yang dipakai sebagai kontrol positif, dibuat konsentrasi 3,0; 2,0; 1,0; 0,5; dan 0,25 µg/ml dari larutan induk yang berkonsentrasi 500 µg/ml.

Pembuatan media RPMI 1640, larutan *phosphate saline buffer* (PBS), larutan tripsin, dan larutan biru tripan, pengaktifan, pembiakan, dan pengembangan sel HeLa dilakukan sesuai metode yang dipakai oleh Freshney⁽¹²⁾. Adapun kepadatan sel HeLa dihitung dengan menggunakan hemositometer dengan mencampurkan 20 µl suspensi sel dengan 180 µl larutan biru tripan pada perbesaran 100 x. Penghitungan sel dilakukan pada 4 bilik hitung yang masing-masing terdiri dari 16 kotak dan diambil rata-ratanya, kemudian dikalikan dengan faktor pengenceran dan faktor koreksi untuk setiap bidang besar (volume 10⁻⁴ ml). Jumlah sel dihitung dengan rumus:

$$\frac{n}{4} \times P \times 10^4 \text{ sel/ml}$$

dimana n = jumlah sel dalam 4 bilik
4 = jumlah bilik haemocytometer yang dihitung
10⁴ = kapasitas haemocytometer per ml
P = faktor pengenceran

Uji sitotoksitas dengan metode penghitungan langsung (*viable cell count*) dilakukan dengan membagi 5 kelompok pengujian, yaitu media ditambah sel sebagai kontrol negatif, sel ditambah pelarut (yaitu DMSO) sebagai kontrol pelarut, sel ditambah cisplatin sebagai kontrol positif yang dibuat sebanyak 5 konsentrasi, yaitu 3,0; 2,0; 1,0; 0,5; dan 0,25 µg/ml. Pengujian ekstrak etanol 70% dilakukan dengan 6 konsentrasi, yaitu 156,25; 78,12; 39,06; 19,53; 9,76; dan 4,88 µg/ml, demikian pula pengujian ekstrak kloroform yang menggunakan konsentrasi 78,12; 39,06; 19,53; 9,76; 4,88; dan

2,44 µg/ml. Masing-masing konsentrasi tersebut dimasukkan ke dalam lempeng 96 sumuran sebanyak 100 µl, ditambahkan suspensi sel sebanyak 100 µl. Seri kadar diulang tiga kali (triplo) agar lebih valid. Kultur kemudian diinkubasi selama 24 jam pada 37°C. Untuk menghitung jumlah sel yang hidup (berwarna kuning) maupun mati (berwarna biru), diambil 50 µl dan direaksikan dengan tripan biru sebanyak 50 µl selama 3 menit. Hasil reaksi tersebut disuspensi dan diambil 10 µl untuk dihitung jumlah selnya. Persentase kematian sel dengan metode penghitungan langsung (*viable cell count*) dihitung menggunakan rumus yang dipakai oleh Doyle dan Griffith⁽¹³⁾, yaitu :

$$\% \text{ viabilitas} = \frac{\text{jumlah sel yang hidup}}{\text{Jumlah sel hidup} + \text{mati}} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = 100\% - \% \text{ viabilitas}$$

Angka persen kematian yang diperoleh dari masing-masing konsentrasi diubah ke dalam angka probit dengan menggunakan tabel probit. Selanjutnya, dibuat persamaan regresi linier untuk melihat hubungan antar-perlakuan dengan kematian sel HeLa. Perhitungan dengan cara probit ini diulangi dengan memasukkan angka 5 sebagai probit ke dalam persamaan regresi linier, hasilnya kemudian disubsitusi dan dianti-logaritma untuk mendapatkan nilai LC₅₀.

HASIL DAN PEMBAHASAN

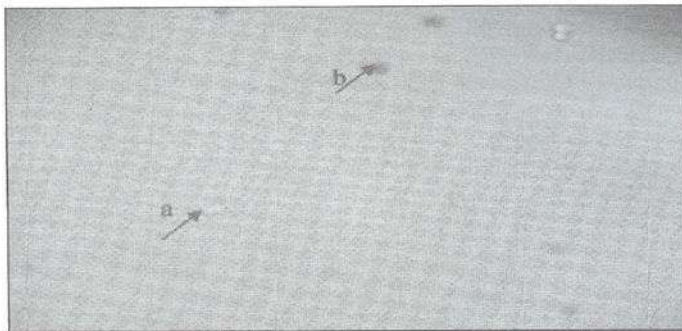
Daun srikaya (*Annona squamosa*) yang dipakai adalah dalam bentuk kering karena kadar air yang lebih sedikit memudahkan cairan pengekstrak masuk ke dalam sel dan menarik zat aktif yang terkandung secara sempurna. Proses pengeringan dilakukan dengan cara diangin-anginkan untuk menghindari kerusakan senyawa aktif akibat pemanasan tinggi di bawah sinar matahari langsung. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan cara maserasi karena cara ini lebih sederhana, mudah dikerjakan dan biaya yang diperlukan relatif murah.

Pemilihan etanol 70% sebagai pelarut diharapkan dapat menarik zat-zat berkhasiat yang terdapat dalam simplisia. Dari hasil uji identifikasi golongan kimia terbukti bahwa ekstrak etanol 70% mengandung beberapa senyawa yang berkhasiat, seperti alkaloid, tanin, sterol, saponin, flavonoid, triterpenoid, dan glikosida. Etanol 70% juga dianggap lebih optimal karena proses maserasi dari bahan kering memerlukan pembasahan terhadap simplisia sehingga lebih optimal dibandingkan etanol 96% karena mengandung jumlah air yang lebih banyak.

Fraksinasi dilakukan dengan cara partisi cair-cair menggunakan pelarut kloroform. Pelarut ini dipilih karena dari uji pendahuluan dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) terbukti ekstrak kloroform lebih toksik dibanding ekstrak etanol 70%⁽⁵⁾. Dari hasil uji identifikasi golongan kimia terbukti bahwa kloroform dapat melarutkan beberapa zat berkhasiat seperti alkaloid, saponin, triterpenoid, steroid, dan glikosida yang berpotensi sebagai antikanker. Sediaan larutan uji, baik ekstrak etanol 70% maupun kloroform, dilarutkan ke dalam DMSO 0,25% karena sukar larut dalam air. DMSO dipilih sebagai pelarut karena tidak bersifat toksik terhadap sel.

Sel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel HeLa karena merupakan satu jenis sel kanker yang banyak diderita wanita di seluruh dunia. Sel ini sering digunakan dalam penelitian karena perkembangannya mudah dikontrol dan ditangani. Sel HeLa merupakan turunan dari sel epitel leher rahim (*cervix*) manusia yang dikembangbiakkan secara *in vitro*.

Uji sitotoksitas dilakukan dengan metode perhitungan langsung. Metode ini dilakukan dengan cara menambahkan larutan biru tripan pada setiap sumuran agar dapat membedakan sel yang hidup dan yang mati. Sel yang mati akan terlihat berwarna biru, karena mengalami lisis sehingga protein dalam plasmanya akan berikatan dengan biru tripan sehingga sel menjadi berwarna biru (Gambar 2). Hal ini tidak terjadi pada sel yang hidup karena tidak mengalami kerusakan pada membran selnya.

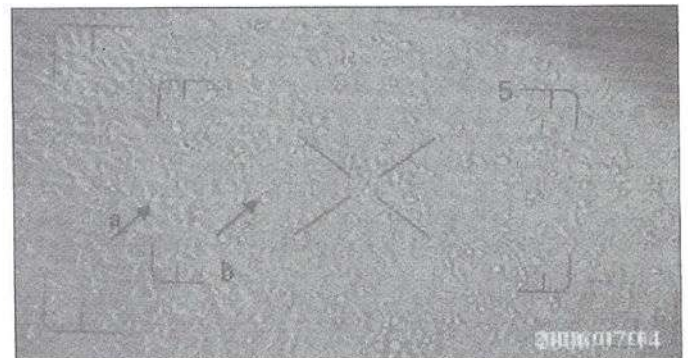


Gambar 2. a) Sel HeLa yang masih hidup terlihat jernih.
b) Sel HeLa yang mati bereaksi dengan biru tripan.

Pengamatan di atas dibantu dengan melihat morfologi sel HeLa di mana sel yang mati akan terlihat berwarna lebih gelap, dan bentuknya tidak bulat lagi sedangkan sel yang hidup masih terlihat berbentuk bulat, lebih terang dan jernih (Gambar 3). Seluruh

sel yang mati dan yang hidup, yang menyinggung garis batas sebelah kiri, dihitung (sedangkan sel yang menyinggung garis batas sebelah kanan atau garis bawah tidak dihitung). Persentase kematian dihitung dari data jumlah sel yang hidup kemudian ditransformasikan ke tabel probit untuk menentukan LC_{50} .

Dari hasil pengujian cisplatin sebagai kontrol positif diperoleh LC_{50} sebesar 0,4075 $\mu\text{g/ml}$. Cisplatin, yang merupakan salah satu obat antikanker golongan kompleks platinum, dapat mengganggu sintesis DNA dan RNA dari sel kanker pada saat siklus sel, khususnya ketika sel berada pada fase G_1 dan S. Cisplatin yang masuk ke dalam sel akan terikat pada N7 guanin DNA membentuk hubungan melintang dan saling mengikat (*cross-linking*) antara rantai-rantai DNA di dalam inti sel sehingga terjadi kerusakan pada DNA dan RNA sel. Kerusakan ini akan menyebabkan penggandaan DNA terganggu dan proses proliferasi akan terhambat^(14,15).



Gambar 3. a) Sel HeLa yang mati.
b) Sel HeLa yang masih hidup.

Nilai LC_{50} ekstrak etanol 70% adalah 7,6984 $\mu\text{g/ml}$ dan nilai LC_{50} fraksi kloroform 4,5467 $\mu\text{g/ml}$. Berdasarkan nilai LC_{50} yang diperoleh dari penelitian ini diketahui bahwa daun srikaya mempunyai sifat sitotoksik. Nilai LC_{50} dari cisplatin sebagai antikanker yang telah banyak digunakan tidak jauh selisihnya dari nilai LC_{50} daun srikaya.

Rendahnya aktivitas sitotoksik pada ekstrak etanol 70% kemungkinan disebabkan karena dalam ekstrak tersebut terdapat beragam senyawa baik yang bersifat polar, semi polar maupun non-polar sehingga efek toksiknya saling mempengaruhi.

Zat antikanker yang dihasilkan dari tanaman, terutama produk alamiah seperti ekstrak, mempunyai mekanisme kerja yang hampir sama dengan obat antikanker golongan antimikotika yang menghambat

proses mitosis pada metafase. Zat aktif yang terdapat pada ekstrak tanaman obat tersebut akan terikat pada protein mikrotubular, tepatnya tubulin pada GTP, dan akan menghambat kemampuan tubulin untuk berpolimerisasi membentuk mikrotubulus sehingga menghambat pemisahan kromosom dan proliferasi sel^(14,16).

Menurut Meyer *et al.*⁽¹⁷⁾, apabila nilai $LC_{50} < 30 \mu\text{g/ml}$ maka zat tersebut bersifat sitotoksik atau berpotensi sebagai antikanker. Hasil penelitian membuktikan bahwa larutan uji, yaitu ekstrak etanol 70% dan fraksi kloroform daun srikaya (*Annona squamosa*) memiliki efek sitotoksitas terhadap sel HeLa sehingga mempunyai potensi sebagai zat anti-kanker walaupun fraksi kloroform lebih tinggi daya sitotoksiknya.

SIMPULAN

Daun srikaya (*Annona squamosa*) mempunyai potensi sebagai bahan alami antikanker karena dari hasil penelitian ekstrak etanol 70% dan fraksi kloroform daun srikaya memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa dengan nilai LC_{50} sebesar $7,6948 \mu\text{g/ml}$ untuk ekstrak etanol dan $4,5467 \mu\text{g/ml}$ untuk fraksi kloroform. Fraksi kloroform lebih bersifat sitotoksik terhadap sel HeLa dibandingkan ekstrak etanol 70% .

DAFTAR PUSTAKA

1. Ratna. Apa yang harus anda ketahui tentang kanker (artikel on line). Diambil dari: <http://www.Indosiar.co.id/infomedis>. Diakses tanggal 9 Desember 2005.
2. Eckholom P. Masalah kesehatan. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia; 1982. hal. 67-8.
3. Urivi, V. Menu untuk penderita kanker. Jakarta: Puspa swara; 2002. hal. 3, 30-2.
4. Sastomidjojo S. Obat asli Indonesia. Jakarta: Pustaka Rakyat; 1997. hal. 6-9.
5. Sudarsono. Tumbuhan obat II. Yogyakarta: Pusat Studi Obat Tradisional Universitas Gajah Mada; 2002. hal. 9-12.
6. Dalimarta S. Atlas tumbuhan obat Indonesia. Jilid II. Jakarta: Puspa Swara; 2003. hal. 45-7.
7. Wahyono S, Rachman A. Uji toksisitas beberapa tumbuhan obat Indonesia dengan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Dalam: Majalah Farmasi Indonesia. 1995. 108-44.
8. Departemen Kesehatan RI. Materia Medika Indonesia Jilid V. Jakarta: Departemen Kesehatan RI; 1989. hal. 523-55.
9. Harborne. Metode fitokimia. Terbitan kedua. Terjemahan dari: Phytochemical methods. Oleh: Padmawinata, Kosasih, Iwan S. Bandung: ITB; 1996. hal. 6, 147.
10. Departemen Kesehatan RI. Sediaan Galenik. Jakarta: Dirjen POM Departemen Kesehatan RI; 1986. hal. 10-2.
11. Departemen Kesehatan RI. Materia Medika Indonesia Jilid II. Jakarta: Departemen Kesehatan RI; 1995. hal. 155.
12. Freshney RI. Animal cell culture. A practical approach. 1st ed. Washington DC: IRL Press; 1987. p. 3, 38, 83-8, 309-12, 329-30, 336-7.
13. Doyle A, Griffiths JB. Cell and tissue culture for medical research. New York: John Wiley & Sons; 2000. p. 12-6, 48-9, 409.
14. Tjay T, Rahardja K. Obat-obat penting, penggunaan dan efek-efek sampingnya. ed. V. Jakarta: Dirjen POM Depkes RI; 2002. hal. 197-8, 206-17.
15. Rosliana R, Nuryangsih S, Karyani A. Uji sitoksitas infus jamur kuping hitam (*Auricularia polytricha*). Dalam: Laporan Program Kreativitas Mahasiswa (PKM). Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta. 2004. 22.
16. Harvey AR, Champe CP. Farmakologi ulasan bergambar. ed. IV. Jakarta: Widya Medika; 2001. hal. 94-5, 398-9.
17. Meyer BN, Ferrigni N R., Putnam JE, Jacobson LB, Nicholas DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituent, *Plant. Med.* 1982.31:34-45.