

PENGARUH SITOTOKSIK EKSTRAK BUAH MAHKOTADEWA [*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl.] TERHADAP SEL KANKER LESTARI HeLa

Pertamawati

Pusat Teknologi Farmasi dan Medika – BPPT
Gedung II BPPT Lantai 15, Jl. MH. Thamrin No.8 Jakarta Pusat 10340

Abstract

Fruits of mahkotadewa (Phaleria macrocarpa (Scheff) Boerl). has been used to cure various health problems, including empirical treatment for cancer. The therapeutic effect of natural material is related to the chemical compounds it contain. In fruits of Phaleria macrocarpa, various chemicals are present such as flavonoid and tannin, both show anticancer activity, as well as other unknown ones presumably supportive for cancer treatment. An in vitro experiment is therefore set up with the objective of examining the effect of fruit extract on human uterine cervical carcinoma cells (HeLa cells). Various concentrations: 5, 10, 25, 50 and 100 ppm of fruit extract were evaluated. Observations were made 24, 72 and 120 hour after incubating HeLa cells in each treatments. The results showed that fruit might inhibit the growth of HeLa cells. Inhibitory concentration (IC_{50}) of fruit extract after 24 hours of incubation is 6,21 ppm, after 72 hour of incubation is 5,09 ppm dan 5,73 ppm for 120 hour of incubation. Inhibitory potential of fruits in 72 hour of incubation is a highest ones. The effect might be associated to the active compounds contained in these material.

Kata Kunci : Pengaruh sitotoksik, ekstrak buah mahkotadewa, sel HeLa.

1. PENDAHULUAN

Buah mahkotadewa secara empiris telah banyak digunakan untuk mengatasi berbagai macam keluhan dan penyakit, salah satu diantaranya ialah penyakit kanker. Penyakit kanker saat ini masih menempati urutan atas penyebab kematian dan sangat ditakuti orang. Penggunaan buah mahkotadewa untuk pengobatan terhadap penyakit kanker antara lain kanker rahim memberikan hasil yang cukup memuaskan. Untuk itu dilakukan penelitian secara ilmiah untuk mengetahui efek toksik buah mahkotadewa terhadap sel-sel kanker lestari (*cell line*) HeLa (Harmanto, 2001).

Efek suatu bahan sangat erat kaitannya dengan senyawa kimia yang terkandung dalam bahan tersebut. Menurut Gotama, *et al.* (1999), kulit buah mahkotadewa masak fisiologis yang sudah berwarna merah mengandung senyawa alkaloid, saponin, fenol dan flavonoid, sedangkan menurut J.J. Willaman (1995) dan de Padua, *et al.* (1999), flavonoid bersifat sebagai antitumor, anti HIV, immunostimulant, antioksidan,

analgesik, antiradang (anti inflamasi), antivirus, antibakteri, antifungal, antidiare, antihepatotoksik, antihiper-glikemik dan sebagai vasodilator.

De Padua, *et al.* (1999) juga menyatakan bahwa senyawa saponin merupakan larutan berbuih dan diklasifikasikan oleh struktur aglycon ke dalam triterpenoid dan steroid saponin. Kedua senyawa tersebut bersifat sebagai anti inflamasi, analgesik, dan sitotoksik. Sedangkan fenol ataupun polifenol merupakan kelompok yang sangat luas dari metabolit sekunder tanaman seperti komponen fenolik sederhana, tanin, quinon, anthosianin, dan lain-lain, dimana masing-masing senyawa mempunyai efek yang berguna terhadap pengobatan penyakit kanker, misalnya tanin yang mempunyai efek antikanker dan antivirus (HIV).

Sel kanker lestari (*cell line*) HeLa merupakan *epithelial-like cells* yang tumbuh secara *monolayers*, pertama kali diinisiasi pada tahun 1951 dan merupakan sel kanker cervix manusia (*human cervic carcinoma*) dari wanita kulit hitam berumur 31 tahun. Belakangan diagnosis tersebut berganti menjadi *adenocarcinoma*, aneuploid

pertama dan selanjutnya kultur cell line manusia tersebut dikenal sebagai *human with IEF of G6PD, MDH, NP*

(<http://www.biotech.ist.unige.it/cldb/cl11601.html>).

Kandungan berbagai senyawa aktif dalam kulit buah mahkotadewa masak fisiologis yang sudah berwarna merah diduga berpengaruh (sitotoksik) terhadap sel HeLa, sehingga diharapkan hasil percobaan yang diperoleh berguna untuk menambah perbendaharaan ilmiah tentang tanaman mahkotadewa. Buah mahkotadewa yang telah digunakan secara empiris dapat terbukti benar-benar merupakan bahan alam asli yang berkhasiat dan berguna untuk pengobatan alternatif penyakit kanker, mudah didapat, murah harganya dan terjangkau oleh masyarakat

Penelitian ini merupakan penelitian awal yang dilakukan secara eksperimental *in vitro*. Konsentrasi ekstrak buah mahkotadewa yang digunakan ialah 5, 10, 25, 50 dan 100 ppm, kontrol positif doksorubisin yang digunakan ialah 5 ppm ; diujikan terhadap sel HeLa dengan indikator tripane blue. Pengamatan dilakukan pada 24, 72 dan 120 jam setelah sel HeLa diberi perlakuan dan diinkubasi.

2. BAHAN DAN METODE

2.1. Bahan :

Bahan utama penelitian yaitu buah mahkotadewa masak fisiologis yang sudah berwarna merah menyala yang berasal dari tanaman yang tumbuh di daerah Bogor. Buah diidentifikasi dan determinasi di Pusat Penelitian Biologi LIPI – Bogor. Buahnya dipilih yang mulus, tidak cacat dan bukan buah jatuhan, selanjutnya buah diekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol.

Untuk pengujian awal formula antikanker digunakan uji BSLT (Brime Shrimp Lethality Test) dengan bahan uji udang renik *Artemia salina* Leach yang dibiakkan dalam air bergaram laut, sedangkan pengujian terhadap sel kanker secara *in vitro* menggunakan sel kanker lestari HeLa.

Berbagai bahan kimia yang digunakan dalam pengujian terhadap sel kanker secara *in vitro* antara lain ialah nitrogen cair, DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium), PBS (Phosfat Buffer Saline), serum FBS (Fethal Bovine Serum), antibiotika Streptomycin dan Penicillin, DMSO (Dimethyl Sulpho Oxide) , aquadest dan Trypan Blue.

2.2. Alat :

Peralatan yang digunakan antara lain peralatan gelas, peralatan ekstraksi, peralatan uji lethalitas terhadap *Artemia salina* (BSLT) dan peralatan uji aktivitas terhadap sel HeLa.

2.3. Cara Percobaan

2.3.1. Prinsip percobaan

Percobaan yang dilakukan mencakup pembuatan ekstrak, penentuan formulasi ekstrak, uji lethalitas secara BSLT terhadap *Artemia salina* dan uji aktivitas terhadap sel HeLa.

2.3.2. Pembuatan ekstrak buah mahkotadewa

Buah mahkotadewa dikeringkan dalam oven bersuhu 40°C sampai kering (kadar air 3-6%), lalu dihaluskan dan direndam dalam pelarut etanol. Ekstrak cair yang dihasilkan dihilangkan pelarut etanolnya dengan alat pengering berputar (rotavapor) sampai diperoleh ekstrak kental, lalu disimpan dalam alat desikator sampai waktu digunakan (Dirjen POM, Depkes RI, 2000).

2.3.3. Penentuan konsentrasi ekstrak

Terhadap botol-botol uji yang berisi masing-masing ekstrak kental buah mahkotadewa dengan konsentrasi 5, 10, 25, 50 dan 100 ppm dilakukan uji BSLT dengan menggunakan udang renik *Artemia salina* Leach. Pengujian ini dilakukan dalam 3 waktu berbeda dengan 3 kali ulangan. Hasil uji lethalitas berupa nilai LC₅₀ (Lethal Concentration 50%) yang diperoleh selanjutnya digunakan sebagai dasar penentuan konsentrasi ekstrak buah mahkotadewa untuk pengujian terhadap sel HeLa.

2.3.4. Uji lethalitas terhadap *Artemia salina* (BSLT)

Artemia salina ditetaskan dari telur dalam larutan garam dengan salinitas sekitar 33%. Media penetasan telur tersebut diberi aerasi udara dan disinari dengan cahaya lampu. Proses penetasan tersebut dilakukan selama 48 jam. Ke dalam botol uji yang berisi ekstrak kental buah mahkotadewa dengan konsentrasi antara 100 sampai 1000 ppm dimasukkan 1 ml larutan garam dan 20 µL DMSO untuk membantu kelarutan ekstrak tersebut. Setelah ekstrak larut, dimasukkan 20 ekor *Artemia salina* dan ditambahkan larutan garam hingga volume 5 mL. Pengamatan terhadap *Artemia salina* yang mati dilakukan setelah 24

jam. Pembanding negatif (blanko negatif) dibuat dalam botol uji hanya berisi larutan garam dengan penambahan 20 μ L DMSO. Uji BSLT dilakukan dengan 3 ulangan (Meyer, *et al.* 1982).

2.3.5. Uji aktivitas terhadap sel HeLa

2.3.5.1. Preparasi medium pertumbuhan

Medium tumbuh DMEM/F12 (1 kemasan berisi 1,2 gram) dilarutkan dalam 1 L aquadest steril dan ditambah 1,2 gram/Liter NaHCO_3 . Ke dalam 100 mL medium pertumbuhan ditambahkan 10 % serum FBS, 100 IU/ml antibiotik Penicilin dan 100 mg/ml antibiotik Streptomycin. Selanjutnya medium disterilisasi dan siap digunakan untuk pengujian.

2.3.5.2. Preparasi ekstrak buah mahkotadewa

Ekstrak sampel dalam tabung eppendorf yang telah ditentukan konsentrasinya setelah dikeringkan lalu ditambah 960 μ L medium tumbuh dan 40 μ L DMSO untuk membantu kelarutan.

2.3.5.3. Preparasi sel HeLa

Sel HeLa dalam tabung eppendorf yang disimpan dalam tabung nitrogen cair (*cryopreservation*), diambil lalu dihangatkan dengan tangan sampai mencair. Selanjutnya medium dalam tabung eppendorf dibuang sehingga sel akan terlihat menempel di dinding tabung, lalu bilas dengan sedikit larutan PBS (1 ml), kocok-kocok sebentar untuk menghilangkan serum lalu larutan PBS dibuang. Tambahkan 1ml larutan Trypsin 2% lalu inkubasikan dalam inkubator CO_2 pada suhu 37°C dengan konsentrasi CO_2 5% selama 8 menit sampai sel terlepas dari dinding tabung, bila belum terlepas ketuk-ketuk dinding tabung atau tambahkan larutan Trypsin sedikit lagi dan inkubasikan kembali dalam inkubator. Selanjutnya tambahkan media PBS lalu disentrifus dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit. Endapannya diambil dan masukkan dalam tabung eppendorf baru dan tambahkan 10 mL medium, dihomogenkan dengan vortex dan siap digunakan untuk uji aktivitas.

2.3.5.4. Pengujian aktivitas formula

Pekerjaan dilakukan dalam Laminar Air Flow. Sampel dilarutkan dalam medium dengan volume tertentu dan ditambahkan 40 μ L DMSO/ml untuk membantu kelarutan. Ke dalam lubang uji *Disposable Plate* ditambahkan 800 μ L medium, 100 μ L formula ekstrak yang diuji dan 100 μ L sel

HeLa yang telah dihomogenkan. Cawan uji diinkubasi selama 24, 72 dan 120 jam dalam inkubator CO_2 . Pengujian aktivitas formula terhadap sel kanker untuk tiap-tiap masa inkubasi dilakukan dengan 3 kali ulangan dan setiap ulangan dilakukan 3 kali pengamatan.

2.3.5.5. Pengamatan pertumbuhan sel HeLa

Setelah hari ke 1 (24 jam), hari ke 3 (72 jam) dan hari ke 5 (120 jam), cawan uji dikeluarkan dari inkubator, dibuang mediumnya lalu dialirkan sedikit larutan Trypsin untuk melepaskan sel dari dinding dasar plate dan dihomogenkan, buang larutan Trypsin dan tambahkan 1ml medium tumbuh. Ke dalam cawan uji yang lebih kecil dipipet 90 μ L larutan uji dan ditambah 10 μ L trypan blue, lalu dihomogenkan kembali. Larutan dialirkan ke dalam *haemocytometer* dan dilakukan perhitungan jumlah sel di bawah mikroskop. Sebagai kontrol negatif dilakukan tanpa penambahan ekstrak buah mahkotadewa.

2.3.5.6. Perhitungan LC_{50} (*Lethal Concentration*) ekstrak terhadap sel HeLa

Perhitungan LC_{50} secara analisis probit, dilakukan apabila telah tercapai jumlah sel yang sama pada konsentrasi ekstrak secara berturutan. Hal ini dilakukan untuk menghindari kesalahan perhitungan jumlah sel yang mati bukan karena konsentrasi senyawa dalam ekstrak tetapi karena jumlah (konsentrasi) ekstrak yang berlebihan (D.J. Finney, 1971).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

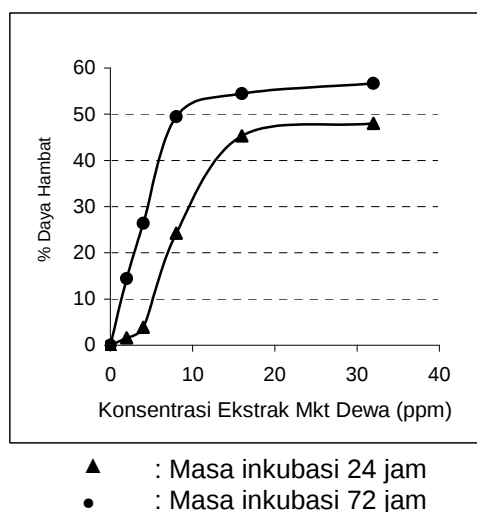
Hasil uji lethalitas terhadap *Artemia salina* (BSLT) memperlihatkan nilai LC_{50} 8,28 ppm, hal ini mengindikasikan bahwa ekstrak mahkotadewa mempunyai aktivitas fisiologis yang bersifat toksik terhadap udang *Artemia salina*. Dari nilai LC_{50} tersebut selanjutnya ditentukan konsentrasi mahkotadewa dalam uji aktivitas terhadap sel HeLa, yaitu 2, 4, 6, 16 dan 32 ppm

Hasil uji aktivitas ekstrak buah mahkotadewa terhadap sel HeLa tertulis pada Tabel 1. yang mencantumkan besarnya (%) daya hambat pertumbuhan ekstrak etanol buah mahkotadewa terhadap pertumbuhan sel HeLa setelah 24, 72 dan 120 jam masa inkubasi.

Tabel 1. Daya hambat (%) pertumbuhan sel HeLa *in vitro* terhadap berbagai konsentrasi ekstrak etanol buah mahkotadewa setelah masa inkubasi selama 24, 72 dan 120 jam.

Ekstrak buah Mahkotadewa (ppm)	% daya hambat pertumbuhan sel HeLa setelah masa inkubasi selama :		
	24 jam	72 jam	120 jam
Kontrol (-)	0,00	0,00	0,00
2	1,61	14,44	6,37
4	3,85	26,39	12,32
8	24,27	49,44	22,94
16	45,33	54,44	42,89
32	48,00	56,67	44,61

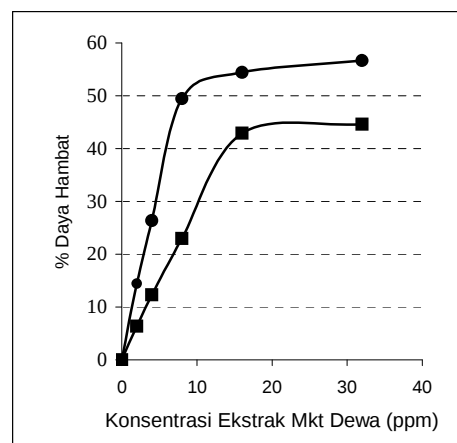
Dari Tabel 1 tersebut terlihat bahwa sel HeLa dalam perlakuan pemberian ekstrak etanol buah mahkotadewa sebanyak 4 dan 8 ppm memperlihatkan peningkatan daya hambat pertumbuhan yang sangat meningkat, baik setelah masa inkubasi selama 24 jam, 72 jam dan 120 jam. Peningkatan daya hambat tersebut tampak jelas bila dilihat dalam Grafik 1 dan Grafik 2 .



Grafik 1. Peningkatan daya hambat pertumbuhan sel HeLa dalam berbagai perlakuan konsentrasi ekstrak mahkotadewa setelah masa inkubasi 24 dan 72 jam

Dari grafik 1 terlihat bahwa baik pada pengamatan 24 jam maupun 72 jam sesudah sel-sel HeLa dalam perlakuan pemberian ekstrak mahkotadewa diinkubasi, menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak yang diberikan, semakin besar pula pengaruh daya hambat pertumbuhan sel HeLa dalam perlakuan tersebut. Semakin lama masa inkubasi juga

semakin meningkatkan persentase daya hambat pertumbuhan sel HeLa.



- : Masa inkubasi 72 jam
- : Masa inkubasi 120 jam

Grafik 2. Peningkatan daya hambat pertumbuhan sel HeLa dalam berbagai perlakuan konsentrasi ekstrak mahkotadewa setelah masa inkubasi 72 dan 120 jam

Grafik 2 memperlihatkan hasil pengamatan setelah masa inkubasi selama 72 jam dan 120 jam. Persentase daya hambat pertumbuhan sel-sel HeLa setelah masa inkubasi selama 120 jam lebih kecil daripada setelah masa inkubasi selama 72 jam pada hampir semua konsentrasi ekstrak mahkotadewa yang diberikan, walaupun Grafik 2 juga menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak mahkotadewa yang diberikan semakin besar pula persentase sel HeLa dalam perlakuan yang mati.

Perhitungan nilai potensi penghambatan (*Inhibitory Concentration* = IC_{50}) ekstrak buah mahkotadewa terhadap sel HeLa setelah masa inkubasi 24, 72 dan 120 jam masing-masing sebesar 6,21 ppm, 5,09 ppm dan 5,73 ppm, atau dengan perbandingan 1,22 : 1,00 : 1,13.

Dengan melihat hasil-hasil tersebut terlihat bahwa pada jam ke 72 nilai IC_{50} ekstrak mahkotadewa untuk sel HeLa adalah yang terbaik, sesudah masa inkubasi 72 jam persentase daya hambat pertumbuhan menurun kembali, hal ini mungkin karena adanya kandungan berbagai senyawa kimia dalam ekstrak mahkotadewa yang bekerja saling menguatkan atau saling melemahkan, menyebabkan sel HeLa bertahan hidup, bermodifikasi, menjadi immun dan tumbuh kembali .

Menurunnya daya hambat pertumbuhan sel HeLa juga sangat mungkin disebabkan oleh macam (jenis) serta konsentrasi (kadar) senyawa aktif terduga dari buah mahkotadewa. Selain itu

dalam buah mahkotadewa sangat mungkin masih mengandung senyawa-senyawa lain yang belum ditemukan oleh peneliti terdahulu, seperti misalnya tanin yang juga mempunyai sifat atau pengaruh antikanker dan antivirus (HIV), sedangkan senyawa anthosianin mempunyai efek yang sangat menunjang untuk penyembuhan kanker seperti efek antieudema.

Disamping buah mahkotadewa, bagian lain dari tanaman tersebut diduga juga mengandung berbagai senyawa yang mempunyai pengaruh serupa, misalnya batang tanaman mahkotadewa yang banyak mengandung tanin dan bergetah (resin). Buah mahkotadewa yang muda dan masih hijau juga mengandung tanin yang lebih banyak daripada buah yang hampir masak. Untuk itu diperlukan penelitian-penelitian yang berkesinambungan untuk lebih meng-ungkapkan kegunaan dan manfaat buah mahkotadewa dan bagian lain dari tanaman ini.

4. KESIMPULAN

Ekstrak pekat buah mahkotadewa mempunyai efek dapat menghambat pertumbuhan sel HeLa (sel kanker rahim) secara *in vitro*.

Persentase daya hambat ekstrak buah mahkotadewa setelah masa inkubasi selama 72 jam adalah lebih besar daripada persentase daya hambatnya setelah masa inkubasi selama 24 jam maupun 120 jam.

DAFTAR PUSTAKA

- de Padua, L. S. , Bunyapraphatsara, N. and Lemmens, R. H. M. S. 1999. Plant Resources of South East Asia No 12(1). Medical and Poisonous Plants 1. Printed in Bogor Indonesia (PROSEA). Leiden, the Netherlands, Backhuys Publishers, 36-48.
- Dirjen POM, Depkes RI, 2000, Buku Panduan Teknologi Ekstrak,
- Finney, D.J. 1971. Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press. New Delhi. 333p
- Gotama, I. B. I. , Sugiarto, S. , Nurhadi, M. , Widiyastuti, Y. Wahyono, S. , Prapti, I. J. 1999. Inventaris Tanaman Obat Indonesia. Jilid V. Jakarta, Departemen Kes. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. 147-148.
- Harmanto, N. 2001. Sehat Dengan Ramuan Tradisional Mahkotadewa. Cetakan Pertama, Tangerang, PT. Agromedia Pustaka. 31-35.
- <http://www.biotech.ist.unige.it/cldb/cl11601.html>. HeLa (human, Black, cervix, carcinoma, epitheloid) diakses 16 Juni 2005.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobson, L. B., Nichols, D. E. and McLaughlin, J. L. Brine Shrimp : A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituent. *Planta Medica*. Volume 45, 1982:31-4.
- Willaman, J. J. Some Biological Effects of The Flavonoids. *Journal of the American Pharmaceutical Assoc. Sei.* 44th Ed. , 1995: 404-409