



Cytotoxic Assay from Stem Bark *Aglaia minahassae* and *Aglaia simplicifolia* Against HeLa Cervical Cancer Cell Lines

Nunung Kurniasih^{1,2*}, Hersa Milawati², Mohamad Fajar², Rizky Abdulah³,
 Desi Harneti Putri Huspa², Unang Supratman^{2,4}

¹Department of Chemistry, Faculty of Science dan Technology, UIN Sunan Gunung Djati,
 Bandung

²Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Science, Universitas
 Padjadjaran, Bandung

³Faculty of Pharmacy, Universitas Padjadjaran, Bandung

⁴Central Laboratory Universitas Padjadjaran, Bandung

Submitted 20 August 2017; Revised 21 October 2017; Accepted 24 October 2017; Published 24 March 2018

*Corresponding author: nunungkurniasih@uinsgd.ac.id

Abstract

Cervical cancer ranks as the second leading cause of female cancer in Indonesia. One of healing methods is chemotherapy, but this method still has many side effects and also expensive treatment. Therefore, natural products discoveries need to be developed due to its important role as an alternative for anticancer drug. The aim of this research was to get IC₅₀ value from methanol, *n*-hexane, ethyl acetate, and *n*-buthanol from stem bark of *A. minahassae* dan *A. simplicifolia*. Stem bark of *A. minahassae* (1.6 kg) and *A. simplicifolia* (1.1 kg) was grounded by methanol and its extract is successively extracted by *n*-hexane, ethyl acetate, and *n*-buthanol. Their extract's cytotoxicity was then evaluated against HeLa cell lines. This research showed that *A. minahassae*'s most cytotoxic extract against HeLa cell lines was *n*-hexane (IC₅₀ = 27.4190 µg/mL) and *n*-buthanol (IC₅₀ = 4.3924 µg/mL). Meanwhile, *A. simplicifolia* most cytotoxic extract against HeLa cell lines was *n*-hexane (IC₅₀ = 23.3098 µg/mL).

Keywords: *A. minahassae*, *A. simplicifolia*, cytotoxic assay, HeLa cell lines

Uji Sitotoksik Kulit Batang *Aglaia minahassae* dan *Aglaia simplicifolia* Terhadap Sel Kanker Serviks HeLa

Abstrak

Kanker serviks menempati urutan kedua jenis penyakit kanker yang diderita wanita Indonesia. Salah satu metode penyembuhannya adalah kemoterapi, tetapi metode ini masih banyak menimbulkan efek samping dan juga biaya pengobatannya mahal. Oleh karena itu, penelitian mengenai senyawa kimia bahan alam yang bersifat antikanker marak dikembangkan. Tujuan penelitian ini adalah menghitung nilai IC₅₀ ekstrak metanol dan hasil fraksinasi kulit batang *Aglaia minahassae* dan *Aglaia simplicifolia*. Sampel *A. minahassae* (1,6 kg) dan *A. simplicifolia* (1,1 kg) masing-masing diekstrak dengan metode maserasi dengan metanol, lalu ekstrak metanol difraksinasi dengan menggunakan pelarut *n*-heksana, etil asetat, dan *n*-butanol. Tiap ekstrak diuji sitotoksitasnya terhadap sel kanker serviks HeLa. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak yang bersifat sitotoksik terhadap sel kanker serviks HeLa dari kulit batang *A. minahassae* adalah dari fraksi *n*-heksana (IC₅₀ = 27,4190 µg/mL) dan fraksi *n*-butanol (IC₅₀ = 4,3924 µg/mL). Sedangkan dari kulit batang *A. simplicifolia* adalah fraksi *n*-heksana (IC₅₀ = 23,3098 µg/mL).

Kata kunci: *Aglaia minahassae*, *Aglaia simplicifolia*, sel kanker serviks HeLa, uji sitotoksik

1. Pendahuluan

Kanker adalah penyebab kematian nomor dua di dunia di belakang penyakit kardiovaskular. Diperkirakan 7,5 juta orang meninggal diakibatkan oleh kanker dan lebih dari 70% kematian terjadi di negara miskin dan berkembang¹. Jenis kanker terbanyak yang terjadi pada wanita di dunia adalah kanker payudara (38 per 100.000 perempuan) dan kanker leher rahim (16 per 100.000 perempuan)².

Di Indonesia, prevalensi kanker adalah sebesar 1,4 per 1.000 penduduk, serta merupakan penyebab kematian nomor 7 (5,7%) dari keseluruhan penyebab kematian³. Estimasi insiden kanker payudara di Indonesia sebesar 40 per 100.000 perempuan dan kanker leher rahim 17 per 100.000 perempuan². Angka ini meningkat dari tahun 2002, dengan insiden kanker payudara 26 per 100.000 perempuan dan kanker leher rahim 16 per 100.000 perempuan². Jenis kanker tertinggi pada pasien rawat inap di rumah sakit seluruh Indonesia tahun 2010 adalah kanker payudara (28,7%), disusul kanker leher rahim (12,8%)². Kasus kanker diperkirakan meningkat hingga 100% pada tahun 2030 mendatang¹. Dua pertiga kasus tersebut terjadi di negara-negara dengan ekonomi rendah hingga menengah.

Pengobatan penyakit kanker tidaklah mudah. Terapi kanker saat ini dilakukan melalui kemoterapi. Namun, cara ini masih belum efektif karena menimbulkan efek samping seperti masih tersisnya sel kanker sehingga penyembuhan kurang tuntas serta terjadi resistensi obat³. Peningkatan angka kejadian kanker yang pesat dan belum adanya terapi yang dianggap tepat untuk mengatasinya menyebabkan eksplorasi bahan-bahan alam yang dianggap potensial sebagai alternatif agen antikanker semakin berkembang⁴. Hal ini terutama dilakukan guna menemukan bahan obat yang memiliki efektivitas tinggi serta efek samping yang rendah terhadap pasien.

Hingga tahun 2011 hanya 2.039 spesies tumbuhan obat atau 0,05% dari total spesies tumbuhan di Indonesia yang telah dilengkapi informasi yang relatif lengkap meliputi: nama ilmiah, nama lokal, jenis habitat, profil

habitat, bentuk kehidupan, bagian tumbuhan yang dijadikan sebagai obat, kandungan kimia, dan kegunaan⁵.

Beberapa obat terapi kanker yang diperoleh dari bahan alam diantaranya adalah paclitaxel (taxol) yang ditemukan pada tahun 1963, diisolasi dari batang tumbuhan *Taxus brevifolia*. Produk tersebut resmi dikomersilkan pada tahun 2000. Alkaloid vinka dari *Catharanthus roseus* seperti vinblastin dan vinkristin sudah digunakan pada terapi kanker limfoma dan leukemia⁶. Dari famili Meliaceae ditemukan nimbolida yang merupakan salah satu senyawa aktif terhadap pengujian antikanker dari tumbuhan *Azadirachta indica*⁷.

Genus terbesar dari famili Meliaceae adalah *Aglaia*, dengan jumlah lebih dari 120 spesies⁸. Daerah penyebaran tumbuhan *Aglaia* ini meliputi wilayah India, Cina bagian Selatan, Asia Tenggara, Australia bagian Utara, dan kepulauan di Samudera Pasifik. Di Indonesia tumbuhan ini dapat ditemui di pulau Sumatera, Kalimantan, Jawa, Sulawesi, Bali, Flores dan Papua⁹.

Peng et al. berhasil mengisolasi senyawa turunan rokaglamida baru dari ranting *A. odorata* yaitu 3'-metoksi-N-demetilrokaglamida yang bersifat sitotoksik terhadap sel kanker serviks HeLa, SGC-7901 dan A-549 dengan nilai IC50 masing-masing sebesar 0,32, 0,12, and 0,25 μ M10. Dua senyawa baru yang merupakan golongan steroid pregnan berhasil diisolasi oleh Zhang et al., dari *A. abbreviata*, yaitu Aglaiasterol A dan D bersifat sitotoksik terhadap sel kanker K562 dengan nilai IC50 masing-masing sebesar 14,4 and 2,8 μ M11.

Tanaman dari genus *Aglaia* yang belum dipublikasi kandungan senyawa dan potensi sitotoksiknya adalah *A. minahassae* dan *A. simplicifolia*, oleh karena itu tujuan penelitian ini adalah mengisolasi senyawa metabolit sekunder dari kulit batang *A. minahassae* dan *A. simplicifolia* dan uji sitotoksiknya terhadap sel kanker serviks HeLa.

2. Metode

2.1. Alat

Peralatan yang digunakan pada

penelitian ini meliputi peralatan gelas yang umum digunakan di Laboratorium Kimia Bahan Alam dan Sintesis. Pemekatan maserat dan fraksi dilakukan dengan menggunakan *rotary evaporator* tipe R 144 Buchi yang dilengkapi dengan sistem vakum B 169 Buchi. Pemisahan senyawa dilakukan dengan menggunakan teknik kromatografi kolom terbuka. Pemantauan pemisahan senyawa dilakukan dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan lampu detektor UV λ 254 nm dan 365 nm serta H_2SO_4 10% (v/v) dalam etanol sebagai pereaksi penampak noda.

Uji aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker serviks Hela menggunakan alat gelas umum dalam pengujian sitotoksik, *microplate* 550 nm, inkubator CO_2 , perangkat sumur kultur, mikropipet, dan *microplate reader*.

2.2. Bahan

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit batang *A. minahassae* dan *A. simplicifolia* yang diperoleh dari Kebun Raya Bogor, Jawa Barat. Tumbuhan dideterminasi di Herbarium Bogoriense, Pusat Penelitian Biologi, LIPI, Bogor, Jawa Barat. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah beberapa pelarut umum pada teknik isolasi bahan alam berupa larutan teknis (didestilasi ulang) dan pro-analisis seperti metanol, *n*-heksana, etil asetat, butanol, aseton,

kloroform.

Pemisahan kromatografi menggunakan silika gel 60 (70-230 dan 230-400 mesh, Merck) serta ODS (200-400 mesh, Fuji Silysia), penampakan noda senyawa target diidentifikasi dengan plat TLC (*Thin Layer Chromatography*) silika gel GF254 (Merck, 0.25 mm) yang diikuti dengan penyemprotan penampak noda (H_2SO_4 10 % dalam etanol) dan dipanaskan.

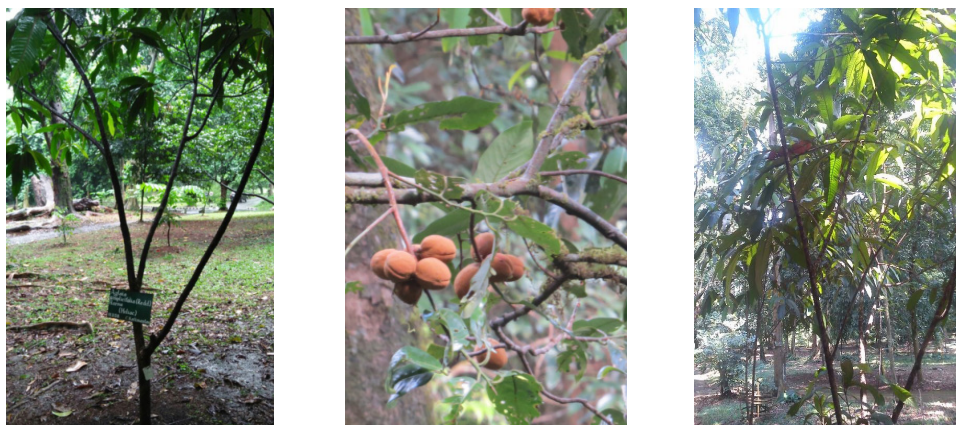
Pengujian aktivitas sitotoksik pada penelitian ini menggunakan kultur sel HeLa. Media kultur yang digunakan adalah RPMI-1640 dan Dubelcco's Modified *Eagles's Medium* (DMEM) yang ditambah serum anak sapi (FBS 10%).

2.3. Prosedur Rinci

2.3.1. Ekstraksi Kulit Batang *A. minahassae* dan *A. simplicifolia*

Kulit batang tumbuhan *A. minahassae* dan *A. simplicifolia* yang telah kering dihaluskan dengan alat penggiling kemudian diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol secara berulang pada suhu ruang. Maserat dipekatkan dengan evaporator vakum pada suhu 40°C.

Ekstrak pekat metanol dilarutkan dalam air:metanol 8:2 kemudian dipartisi berturut-turut dengan menggunakan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan *n*-butanol. Tiap fraksi ditambah zat pengering Na_2SO_4 , disaring, dan dipekatkan sehingga diperoleh



Gambar 1. Penampakan pohon tumbuhan (a) dan buah serta daun *A. simplicifolia* (b) dan penampakan batang tumbuhan *A. minahassae* (c) (Herbarium Bogoriense, 2016)

Tabel 1. Perolehan massa hasil ekstraksi metanol dan partisi *n*-heksana, etil asetat dan *n*-butanol masing-masing sampel *A. minahassae* dan *A. simplicifolia*

Fraksi	Massa (g)	
	<i>A. minahassae</i>	<i>A. simplicifolia</i>
metanol	225,11	192,97
<i>n</i> -heksana	9,38	14,53
etil asetat	7,05	28,03
<i>n</i> -butanol	7,63	14,53

fraksi pekat *n*-heksana, etil asetat, dan *n*-butanol. Setiap fraksi hasil partisi ini diuji sitotoksiknya terhadap sel kanker serviks HeLa sehingga diperoleh ekstrak aktif *n*-heksana, etil asetat dan *n*-butanol.

2.3.2. Penentuan Aktivitas Sitotoksik Isolat terhadap Sel Kanker Serviks HeLa

Penentuan aktivitas sitotoksik ini dilakukan berdasarkan metode yang dilaporkan oleh Marraskuranto *et al.*¹⁵. Sel-sel kanker serviks HeLa dibiakkan dalam medium RPMI-1640 yang diberi serum anak sapi sebanyak 5% dan kanamisin (100 µg/mL). Sel-sel dengan densitas 3×10^4 sel cm^{-3} dibiakkan dalam pelat 96 sumur kemudian diinkubasi selama 24 jam.

Selanjutnya, sampel dengan variasi konsentrasi ditambahkan ke dalam pelat. Sampel terlebih dahulu dilarutkan dalam DMSO sesuai dengan konsentrasi yang diperlukan. Enam variasi konsentrasi selanjutnya dilakukan dengan melarutkan sampel dalam larutan penyangga fosfat (*phosphoric buffer solution*, PBS, pH = 7,30-7,65). Pada pengujian ini, DMSO digunakan sebagai kontrol. Setelah 48 jam inkubasi, pereaksi MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5]-difenil tetrazolium bromida, atau

dikenal sebagai tiazol biru ditambahkan ke dalam tiap sumur dan inkubasi dilanjutkan selama 4 jam. Kemudian reaksi dihentikan dengan menambahkan larutan MTT yang mengandung natrium dodesil sulfat dan inkubasi dilanjutkan selama 24 jam.

Densitas optik ditentukan dengan menggunakan *microplate DYNEX reader* pada λ 570 nm. Sedangkan nilai IC_{50} ditentukan dari grafik persentase sel yang hidup dibandingkan dengan kontrol (%), yang hanya mengandung PBS dan DMSO, terhadap konsentrasi sampel (µg/mL). IC_{50} didefinisikan sebagai konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan sel sebanyak 50%. Pengujian ini dilakukan secara duplo dan nilai yang diperoleh merupakan rata-rata dari seluruh pengujian.

3. Hasil

Perolehan massa hasil ekstraksi metanol dan dilanjutkan dengan partisi bertahap menggunakan tiga pelarut yang berbeda dari masing-masing sampel *A. minahassae* dan *A. simplicifolia* disajikan pada Tabel 1. Setiap ekstrak hasil fraksinasi diuji sitotoksiknya terhadap sel kanker serviks HeLa dan diperoleh nilai IC_{50} yang ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Nilai IC_{50} hasil uji sitotoksik sampel *A. minahassae* dan *A. simplicifolia* fraksi *n*-heksana, etil asetat dan *n*-butanol terhadap sel kanker serviks HeLa

Fraksi	Nilai IC_{50} (µg/mL)	
	<i>A. minahassae</i>	<i>A. simplicifolia</i>
<i>n</i> -heksana	27,4190	23,3098
Etil asetat	-	-
<i>n</i> -butanol	4,3924	-

Gambar 2 menunjukkan hasil kromatografi lapis tipis dari fraksi *n*-heksana, etil asetat dan *n*-butanol dari kulit batang *A. minahassae* dan *A. simplicifolia* yang memperlihatkan pola noda tertentu dan menggambarkan dugaan senyawa metabolit sekunder yang dikandung didalamnya.

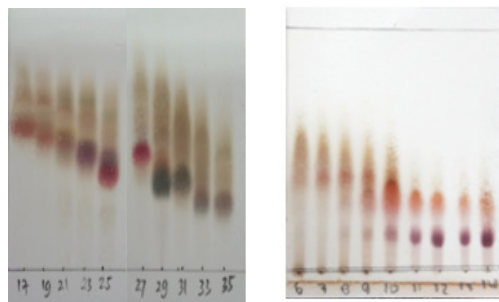
4. Pembahasan

Tahap pertama dari penelitian ini adalah ekstraksi, yaitu proses penarikan senyawa-senyawa yang terdapat pada simplisia oleh pelarut yang sesuai. Sebelum proses ekstraksi dimulai, sampel kulit batang *A. minahassae* dan *A. simplicifolia* disiapkan dengan cara dikeringkan di udara terbuka. Pengeringan sampel berfungsi untuk menghilangkan kandungan air yang tertinggal dalam sampel. Air perlu dihilangkan agar kelembapan sampel berkurang. Sampel yang lembap atau basah adalah medium yang baik untuk tumbuhnya jamur, oleh karenanya perlu dihindari agar senyawa yang terkandung dalam jamur tidak ikut terekstrak selama proses isolasi berlangsung.

Selanjutnya sampel digerus hingga menjadi serbuk, hal ini dimaksudkan untuk memperbesar luas permukaan zat yang akan diekstraksi sehingga meningkatkan kelarutan sampel pada pelarut dalam proses ekstraksi. Setelah digerus, serbuk kulit batang tersebut dimaserasi dengan pelarut metanol. Teknik maserasi dipilih sebab kandungan senyawa yang terkandung dalam sampel masih banyak dan belum diketahui karakteristiknya,

seperti ketahanan senyawa terhadap panas. Umumnya senyawa organik dari bahan alam cenderung termolabil sehingga kurang cocok jika digunakan teknik sokletasi. Selanjutnya, metanol dipilih karena metanol bersifat *magic solvent* yaitu dapat melarutkan senyawa yang bersifat polar maupun bersifat nonpolar. Setelah serbuk kulit batang tersebut dimaserasi, maserat metanol tersebut dipekatkan dengan *rotary evaporator*. *Rotary evaporator* berfungsi untuk menguapkan pelarut dengan prinsip menurunkan tekanan sistem menjadi vakum, oleh karena tekanan turun maka suhu untuk mendidihkan senyawa menjadi turun, maka hanya diperlukan pemanasan minimal untuk menguapkan pelarut dibawah titik didih pelarutnya sebenarnya sehingga ekstrak menjadi pekat.

Sebanyak 225,11 g ekstrak metanol *A. minahassae* dipartisi dengan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan *n*-butanol. Teknik partisi berfungsi untuk partisi atau mengelompokkan senyawa-senyawa berdasarkan kenaikan kepolaran, dari nonpolar, semipolar dan polar. Pelarut-pelarut tersebut dipilih sebagai pelarut organik yang tak bercampur dengan air sebagai prinsip dasar ekstraksi cair-cair dimana senyawa-senyawa pada sampel dapat terdistribusi ke kedua pelarut yang tak saling campur pada pelarut organik dan air. Kemudian masing-masing fraksi dipekatkan dengan *rotary evaporator*, sehingga diperoleh 9,38 g ekstrak *n*-heksana, 7,05 g ekstrak etil asetat dan 7,63 g ekstrak *n*-butanol. Sedangkan dari 194,97



Gambar 2. Kromatogram KLT hasil kromatografi kolom fraksi *n*-heksana pada pelat silika GF254 (a) *A. minahassae* yang dielusi eluen heksana: etil asetat (7:3) (b) *A. simplicifolia* dengan eluen kloroform:etil asetat (5:5) setelah direaksikan reagen penampak noda asam sulfat 10% dalam etanol, dipanaskan, dan diamati dibawah sinar UV λ 365 nm. Noda merah dan ungu merupakan ciri khas senyawa terpenoid, biru steroid.

g ekstrak metanol *A. simplicifolia* diperoleh , 14,53 g ekstrak *n*-heksana, 28,03 g ekstrak etil asetat dan 14,56 g ekstrak *n*-butanol.

Hasil uji sitotoksik masing-masing hasil dari fraksinasi dari kulit batang *A. minahassae* dan *A. simplicifolia* terhadap sel kanker serviks HeLa menunjukkan bahwa fraksi *n*-butanol dari *A. minahassae* memiliki sitotoksitas tertinggi ($IC_{50} = 4,3924 \mu\text{g/mL}$) disusul kemudian fraksi *n*-heksana dari kulit batang *A. simplicifolia* ($IC_{50} = 23,3098 \mu\text{g/mL}$) dan fraksi *n*-heksana *A. minahassae* ($IC_{50} = 27,4190 \mu\text{g/mL}$). Fraksi etil asetat baik dari *A. minahassae* maupun *A. simplicifolia* tidak aktif, begitu juga dengan fraksi *n*-butanol dari *A. simplicifolia*. Hal ini diduga adanya metabolit sekunder dari golongan terpen dan steroid yang dominan terdapat pada fraksi *n*-heksana dan *n*-butanol seperti dapat terlihat pada hasil KLT fraksi tersebut menunjukkan warna biru sebagai ciri khas senyawa dari golongan steroid dan merah serta ungu yang merupakan ciri khas terpenoid.

5. Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukkan ekstrak yang bersifat sitotoksik terhadap sel kanker serviks HeLa dari kulit batang *A. minahassae* adalah dari fraksi *n*-heksana ($IC_{50} = 27,4190 \mu\text{g/mL}$) dan fraksi *n*-butanol ($IC_{50} = 4,3924 \mu\text{g/mL}$). Sedangkan dari kulit batang *A. simplicifolia* adalah fraksi *n*-heksana ($IC_{50} = 23,3098 \mu\text{g/mL}$).

Daftar Pustaka

1. Globocan, International Agency for Research on Cancer (IARC)/ WHO. 2012. *Estimated cancer incidence, mortality, and prevalence worldwide in 2012*. [Diakses pada tanggal 20 Agustus 2016]. Tersedia dari: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx Kemenkes RI. 2013. Informasi dan Data Kesehatan.
2. Handoko, F.F., Maruti, A.A., Rivanti, E. Aktivitas sitotoksik ekstrak etanolik rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata*) terhadap sel kanker Hela dan sel kanker kolon WiDr. *Majalah Kesehatan Pharmamedika*. 2011; 3(1):222-226.
3. Sahid, A., D. Pandiangan., P. Siahaan., dan M. J. Rumondo. Uji Sitotoksitas Ekstrak Metanol Daun Sisik Naga (*Drymoglossum piloselloides* Presl.) terhadap Sel Leukemia P388. *Jurnal MIPA Unsrat Online*. 2013; 2(2), 94-99.
4. Damayanti, E.K., Hikmat, A., Zuhud, E.A.M. Indonesian tropical medicinal plants diversity: problems and challenges in identification. International Workshop "Linking Biodiversity and Computer Vision Technology to Enhance Sustainable Utilization of Indonesian Tropical Medicinal Plants". Bogor. 2011.
5. Sisodiya, Preeti Singh. Plant Derived Anticancer Agents : A Review. *Int. J. Res. Dev. Pharm. L. Sci.* 2013; 2, 293-308.
6. Bodduluru, L.N., Eshvendar, R.K., Nagaraju, T., Chandana, C.B., Ramakrishna, S. Chemopreventive and Therapeutic Effects of Nimbolide in Cancer:the Underlying Mechanisms. *Toxicology in Vitro*. 2014.
7. Pannell, C.M. *Taxonomic Monograph of the Genus Aglaia Lour. (Meliaceae)*. Kew Bulletin Additional Series XVI. HMSO, Kew, Richmond, Surrey, UK. 1992.
8. Su, B., Chai, H., Mi, Q., Riswan, S., Kardono, L.B.S., Afriastini, J. J., Santarsiero, B. D., Mesecar, A. D., Fransworth, N. R., Cordell, G. A., Swanson, S. M., & Kinghorn, D. Activity-guided isolation of cytotoxic constituents from the bark of *Aglaia crassinervia* collected in Indonesia. *J Bioorg. Med Chem*. 2006; 14, 960-972.
9. Peng, L., Fu, W.X., Zeng, C.X., Zhou, L., Bao, M.F., & Cai, X.H. Two New Lignans from Twigs of *Aglaia odorata*. *J of Asian Nat Prod Res*. 2015: 1-6
10. Zhang, F., Zhu, Y., Li, Q., & Cen, J. Four New Pregnane Steroids from *Aglaia abbreviate* and Their Cytotoxic Activities. *Helv. Chim. Acta*. 2016; 99, 73-77.