

# AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL TUMBUHAN SALA (*Cynometra ramiflora* Linn) TERHADAP SEL HeLa, T47D dan WiDR

Haryoto, Muhtadi, Peni Indrayudha, Tanti Azizah, Andi Suhendi

Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta  
Jl. Achmad Yani, Tromol Pos 1 Pabelan, Kartasura, Surakarta 57102  
e-mail: [har254@ums.ac.id](mailto:har254@ums.ac.id)

## Abstrak

Tumbuhan Sala yang dikenal dengan nama latin *Cynometra ramiflora* Linn, dalam Kraton Kasunanan Surakarta sering digunakan sebagai obat asam urat, diabetes, hipertensi dan penyakit lainnya. Tumbuhan tersebut juga dimanfaatkan sebagai obat antikanker. Selanjutnya untuk pembuktian ini perlu dilakukan percobaan dan analisis ekstrak etanol kulit batang dan daun tumbuhan Sala terhadap sel kanker HeLa, T47D dan WiDR. Efek sitotoksisitas ekstrak etanol kulit batang dan daun tumbuhan Sala (*C. ramiflora* Linn) terhadap sel kanker dilakukan dengan tiga jenis sel kanker yaitu sel HeLa, T47D dan WiDR. Kadar IC<sub>50</sub> dihitung dari hasil pengamatan banyaknya persentase sel mati yang diinkubasi selama 24 jam dengan penambahan ekstrak. Setelah dilakukan percobaan aktivitas sitotoksik ekstrak etanol tumbuhan Sala terhadap sel HeLa, T47D dan WiDR memberikan hasil sebagai berikut: IC<sub>50</sub> kulit batang berturut-turut >1000; 0,90 dan 6,29 µg/mL, sedangkan daun tumbuhan Sala mempunyai IC<sub>50</sub> berturut-turut 1,92; 6,37 dan 0,41 µg/mL. Ekstrak kulit batang tumbuhan Sala (*C. ramiflora* Linn) mempunyai IC<sub>50</sub> lebih tinggi dari ekstrak daun. Data tersebut menunjukkan aktivitas sitotoksik ekstrak kulit batang terhadap tiga jenis sel kanker tersebut lebih rendah dibandingkan dengan ekstrak daun.

Kata kunci: *Cynometra ramiflora* Linn, IC<sub>50</sub>, sel HeLa, sitotoksik, T47D, WiDr

## Abstract

*Cynometra ramifolia* Linn is known as Sala plant. This plant, especially in Solo City categorized as rare plant and traditionally used to cure uric acid, diabetes, hypertension, and others pain. It is interesting to know the other activities by done the test for human cancer cell-lines. This research objective to identify the cytotoxicity effects of ethanol extract from *C. ramiflora* the stem bark and leaves against T47D, HeLa and WiDr cancer cell lines. The cytotoxicity test of ethanol extract from *C. ramiflora* the stem bark and leaves determined by MTT assay by calculating the level of IC<sub>50</sub> which was based on the percentage of the cell death following the 24 hours incubation with the extract. The results showed that ethanol extract of stem bark has cytotoxic effect to HeLa, T47D and WiDr cell-lines with the IC<sub>50</sub> of >1000; 0,90 and 6,29 µg/mL respectively. The leave cytotoxic effect to HeLa, T47D and WiDr cell-lines with the IC<sub>50</sub> of 1,92; 6,37 and 0,41 µg/mL respectively. This research indicated that the ethanol extract isolated from *C. ramiflora* leaves a selective cytotoxicity effect to WiDr cell line.

Keywords: *Cynometra ramiflora*, cytotoxicity, HeLa, IC<sub>50</sub>, T47D, WiDr

## **PENDAHULUAN**

Indonesia merupakan Negara kepulauan yang memiliki hutan mangrove terluas di dunia. Hutan mangrove dunia seluas  $\pm$  16.530.000 ha yang tersebar di Asia 7.441.000 ha, Afrika 3.258.000 ha dan Amerika 5.831.000 ha, sedangkan di Indonesia seluas 3.735.250 ha (Ditjen INTAG, 1993). Dengan demikian, luas hutan mangrove Indonesia hampir 50% dari luas mangrove yang ada di Asia dan hampir 25% dari luas hutan mangrove dunia. Hutan mangrove sebagai Salah satu lahan basah di daerah tropis dengan akses yang mudah serta kegunaan komponen biodiversitas dan lahan yang tinggi telah menjadikan sumberdaya tersebut sebagai sumberdaya tropis yang terancam kelestariannya (Onrizal, 2005). Konversi hutan mangrove terus meningkat untuk dijadikan lahan pertanian atau tambak ikan atau udang, sehingga menyebabkan penurunan produktivitas ekosistem tersebut (Dave, 2006). Dalam kurun waktu 25 tahun, hutan mangrove dunia hilang sebesar 35% dan hutan mangrove Indonesia yang rusak mencapai 57,6% (Ditjen RLPS., 2001).

Selanjutnya di lingkungan area Kraton Kasunanan Surakarta Hadiningrat sebelum didirikan bangunan kraton merupakan daerah rawa yang luas dan memiliki berbagai macam jenis tumbuhan. Di antara

tumbuhan mangrove yang ada di area lingkungan Keraton Surakarta Hadiningrat, Surakarta, Jawa Tengah adalah tumbuhan Salayang memiliki nama latin *Cynometra ramiflora* Linn. Tumbuhan jenis ini merupakan tumbuhan yang langka, dan berdasarkan penelusuran pustaka yang telah dilakukan, masih sedikit penelitian dan data tentang kandungan kimia dan kajian secara farmakologis. Padahal berdasarkan pengalaman empiris, ekstrak air (godogan) dari daun dan batang tumbuhan Sala dapat digunakan untuk membantu penyembuhan berbagai penyakit seperti hipertensi, diabetes, asam urat dan kolesterol. Oleh karena itu, penting untuk dilakukan kajian tentang penyelidikan kandungan kimia, efek farmakologi, toksisitas dan formulasi untuk dimanfaatkan menjadi obat herbal terstandar atau ramuan jamu yang memiliki landasan ilmiah yang kuat (*scientific based*). Hasil penelitian sebelumnya menyatakan bahwa tumbuhan *Cynometra ramiflora* Linn dari beberapa Negara berpotensi sebagai antibakteri (Khan *et al.*, 2006), antioksidan (Bunyaphatsara *et al.*, 2003), antidiabetes (Tiwari dkk, 2008), aktif terhadap beberapa sel uji kanker, seperti *human gastric, colon* dan *breast cancer cell lines* (Uddin dkk., 2009).

Kanker merupakan istilah umum untuk kelompok penyakit yang dapat mempengaruhi setiap bagian tubuh. Kanker

ialah suatu penyakit sel dengan ciri gangguan atau kegagalan mekanisme pengatur multiplikasi dan fungsi homeostatis lain pada organisme multi seluler (Loomis, 1978).

Kanker sebenarnya merupakan suatu tumor atau neoplasma atau neoplastoma yang terdiri dari tumor jinak (benign, benigna) dan tumor ganas (malignant, maligna, kanker). Kanker dibedakan menjadi dua yaitu sarkoma dan karsinoma. Sarkoma bersifat luas/mensensimal misalnya fibrosarkoma, limposarkoma, osteosarkoma. Sedangkan karsinoma bersifat epitelial sebagai contoh kanker payudara, kanker lambung, kanker uterus, kanker kulit (Khan *et al.*, 2006). Uji sitotoksik adalah uji toksisitas secara *in vitro* menggunakan kultur sel yang digunakan untuk mendeteksi adanya aktivitas antineoplastik dari suatu senyawa. Penggunaan uji sitotoksik pada kultur sel merupakan Salah satu cara penetapan *in vitro* untuk mendapatkan obat-obat sitotoksik. Sistem ini merupakan uji kuantitatif dengan cara menetapkan kematian sel.

Parameter yang digunakan untuk uji sitotoksik yaitu nilai  $IC_{50}$ . Nilai  $IC_{50}$  menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai ini merupakan patokan untuk melakukan uji

pengamatan kinetika sel (Cho *et al.*, 1998). Nilai  $IC_{50}$  dapat menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai sitotoksik. Semakin besar harga  $IC_{50}$  maka senyawa tersebut semakin tidak toksik.

Bagian akhir uji sitotoksik dapat memberikan konsentrasi yang maksimum yang masih memungkinkan sel mampu bertahan hidup. Bagian akhir uji sitotoksitas pada organ target memberikan informasi langsung tentang perubahan yang terjadi pada fungsi sel secara spesifik (Djajanegara dan Wahyudi, 2009).

Berdasarkan latar belakang di atas maka tujuan pada penelitian ini adalah mengetahui efek sitotoksik Ekstrak Etanol dari kulit batang dan daun tumbuhan Sala (*Cynometra ramiflora* Linn) terhadap selHeLa, T47D dan WiDR.

## **METODE PENELITIAN**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kain hitam, blender, peralatan maserasi, *rotary evaporator*, penangas air, tangki nitrogen cair, *autoclave*, pipet pasteur, steril mikroskop fase kontras (Olympus Japan), sentrifuge Sigma 3K12 (B. Braun Biotech International), inkubator  $CO_2$ , ELISA *reader* (ELX 800 Bio Tech), hemisitometer (New Bauer), tabung konikal steril (nunclone), *scraper*, *tissue culture flask* (nunclone), ampul, *blue tape* steril,

*yellow tape* steril, water bath EMTD-204 (Nuohai), *Camera digital* (Sony), printer epson (Lx-300+11), botol duran (100 mL dan 500 mL), crytube, *Laminar Air flow* (Nuair), pH meter (Toa Electrics Ltd), *microplate* 96 sumuran, *micropipet* (Soccorex), *vortex* (Genie), timbangan elektrik (Sartorius), corong, kertas saring, oven, cawan penguap, lampu UV, pipa kapiler, dan bejana elusi.

Kulit batang dan daun tumbuhan Sala (*Cynometra ramiflora* Linn) dikumpulkan dari Kraton Kasunanan Surakarta, Jawa Tengah, Indonesia. Dikoleksi pada tanggal 22 Juni 2012.

Ekstraksi dari kulit batang dan daun tumbuhan Sala (*Cynometra ramiflora* Linn) menggunakan serbuk kulit batang dan daun sebanyak 500 gram kemudian direndam dengan 3,75 liter etanolik 96%, selanjutnya di maserasi selama 3x24 jam kemudian disaring sehingga didapatkan larutan. Larutan yang diperoleh selanjutnya dilakukan evaporasi sampai kental yang disebut dengan ekstrak.

Sel HeLa (ditemukan di jaringan servik manusia), T47D (sel tumor yang ditemukan di payudara manusia) and WiDr (sel yang ditemukan usus besar). Tiga jenis sel kanker tersebut tersedia di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM Yogyakarta. Seluruh sel kanker tumbuh di dalam media RPMI 1640 (Sigma) yang

mengandung 5% v/v FCS (fetal calf serum) (Sigma) dan 1 % v/v fungison (Sigma) yang ditambahkan dengan 1% w/v penicilin-streptomycin (Sigma) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dengan inkubator berisi 5% gas CO<sub>2</sub>.

Uji sitotoksik dengan metode MTT Suspensi sel dalam media lengkap sebanyak 100 µL (kepadatan 10.000 sel/sumuran) dimasukkan ke dalam *plate* 96 dan *plate* diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO<sub>2</sub>5%. Di akhir inkubasi, media pada masing-masing sumuran dibuang, kemudian ditambahkan media baru dan sampel 100 µL dalam tiap sumuran yang berbeda sehingga diperoleh kadar akhir sampel dengan variasi kadar tertentu (sampel: 250, 150, 100, 50, 25 µg/mL). Selanjutnya *plate* diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% selama 24 jam pada suhu 37°C. Pada akhir inkubasi, medium pada masing-masing sumuran dibuang, dicuci dengan PBS sebanyak 100 µL, kemudian ditambahkan 100 µL MTT 5 mg/mL dalam PBS. *Plate* diinkubasi lagi selama 4 jam pada suhu 37°C. Sel hidup akan bereaksi dengan MTT (3-(4,5-dimetil thiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid) membentuk formazan yang berwarna ungu. Reaksi pembentukan formazan dihentikan dengan larutan SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*) 10% dalam HCl 0,01N, lalu diinkubasi selama semalam pada suhu kamar. Pada

akhir masa inkubasi serapan dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 550 nm. Persentase sel hidup dihitung melalui data absorbansi sel kemudian dibuat kurva hubungan log konsentrasi *versus* nilai % sel hidup dan dihitung harga IC<sub>50</sub>-nya.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui seberapa besar potensi sitotoksik ekstrak daun dan kulit batang tumbuhan Sala terhadap 3 sel kanker yaitu sel HeLa, T47D dan WiDR secara *in vitro*. Metode yang digunakan dalam uji sitotoksik ini adalah metode MTT. Dasar pengukuran metode MTT adalah pengukuran kristal formazan yang terbentuk. Kristal formazan merupakan kristal ungu yang tidak larut air tapi dalam SDS 10% larut. Pembentukan kristal formazan merupakan hasil reaksi antara garam MTT dengan sistem reduktase suksinat tetrazolium yang terdapat dalam mitokondria sel hidup (Doyle and Griffiths, 2000). Jadi sel kanker yang hidup akan mampu membentuk kristal formazan yang lebih banyak dari pada sel kanker yang sudah mati.

Sampel berupa ekstrak harus cukup larut dalam pelarut, oleh karena itu dicari pelarut yang dapat melarutkannya. Pelarut yang dipilih dalam penelitian ini adalah DMSO karena dapat melarutkan ion

anorganik dan organik. Djajanegara dan Wahyudi (2009) menjelaskan DMSO tidak toksik terhadap sel kanker. Kontrol DMSO yang digunakan adalah konsentrasi DMSO yang tertinggi yang digunakan untuk melarutkan sampel.

Pengamatan potensi sitotoksik pada sel kanker adalah dengan cara menghitung persentase sel hidup. Konsentrasi sampel dibuat log agar didapatkan persamaan yang lebih linier, kemudian dibuat persamaan *regresi linier* antara log konsentrasi vs persentase sel hidup. Nilai IC<sub>50</sub> merupakan konsentrasi yang dapat mematikan setengah dari sel kanker. Besarnya potensi sitotoksik digambarkan oleh kecilnya nilai IC<sub>50</sub>.

Preparasi sampel dilakukan dengan melarutkan ekstrak dalam dimetil sulfoksida (DMSO) yakni pada kadar 250 µg/mL dengan DMSO 0,3%. Penggunaan DMSO dikarenakan mampu melarutkan ion organik dan anorganik (Fessenden & Fessenden, 1994). Pada penelitian terdahulu penggunaan DMSO sampai konsentrasi 1,67% v/v tidak mempengaruhi viabilitas sel T47D. Sampel selanjutnya di-*treatment* dengan larutan uji dengan 5 konsentrasi. Selanjutnya untuk memudahkan pengamatan digunakan reagen MTT (3-(4,5-dimethyliazol-2-yl)-2,5-dipheniltetrazolium bromide). Enzim dehidrogenase pada mitokondria sel akan mengubah MTT berwarna kuning yang larut

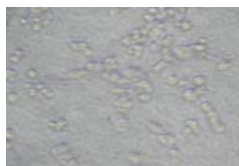
air menjadi bentuk formazan berwarna ungu yang tidak larut air. Intensitas warna ungu tersebut menyatakan banyaknya sel aktif yang hidup, sebab enzim mitokondria pada sel aktif memetabolisme garam tetrazolium sehingga terjadi pemutusan cincin tetrazolium oleh enzim dehidrogenase yang menyebabkan tetrazolium berubah menjadi formazan (Suhendi dkk., 2013). Semakin berwarna ungu maka semakin banyak sel yang masih hidup. Setelah inkubasi selama 4 jam dari penambahan MTT, reaksi

dihentikan dengan SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*) 10% (Haryoto, 2013).

Penambahan SDS sebagai larutan *Stooper* dengan cara mendenaturasi protein menjadi unit polipeptida dan membentuk kompleks SDS-polipeptida. Setelah reaksi dihentikan kompleks berwarna ungu yang terbentuk dibaca serapannya pada ELISA *reader* dengan panjang gelombang 550 nm. Absorbansi yang didapatkan dijadikan acuan untuk menghitung persentase sel hidup.

Tabel 1. Rekapitulasi Potensi Sitotoksik Ekstrak Etanol Daun dan kulit batang Tumbuhan Sala

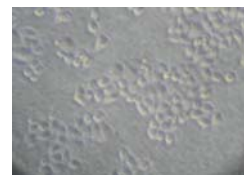
Sel Kanker	IC <sub>50</sub> (ppm)	
	Ekstrak Daun	Ekstrak Kulit Batang
Sel HeLa	1,92	>1000
Sel T47D	6,37	0,90
Sel WiDR	0,41	6,29



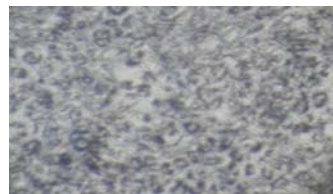
Sel HeLa



Sel T47D



Sel WiDR



Kristal Formazan. Kristal berwarna ungu dari hasil reduksi garam MTT dengan Enzim tetrazolium suksinat reduktase pada sel mitokondria

Gambar 1. Perbandingan Sel Kanker dengan Kristal Formazan

Tabel 1 merupakan hasil rekapitulasi potensi sitotoksik ekstrak etanol daun dan kulit batang tumbuhan Sala. Tabel tersebut menunjukkan bahwa ekstrak daun paling sitotoksik terhadap sel WiDR yang mempunyai  $IC_{50}$  sebesar 0,41 ppm dibanding dengan sel HeLa dan sel T47D. Selanjutnya ekstrak kulit batang paling sitotoksik terhadap sel T47D yang mempunyai nilai  $IC_{50}$  sebesar 0,90 ppm, dibanding dengan sel T47D dan sel WiDR. Suatu ekstrak mempunyai aktivitas antikanker dinyatakan sebagai berikut: (1)  $IC_{50} \leq 5\mu\text{g/mL}$  dikategorikan sangat aktif; (2)  $IC_{50} = 5-10\mu\text{g/mL}$  dikategorikan aktif; (3)  $IC_{50} = 11-30\mu\text{g/mL}$  dikategorikan sedang; dan (4)  $IC_{50} \geq 30\mu\text{g/mL}$  dikategorikan tidak aktif (Cho et al., 1998).

## KESIMPULAN

Aktivitas sitotoksik ekstrak etanolik tumbuhan Sala (*C. ramiflora* Linn) terhadap sel HeLa, T47D dan WiDR, bahwa ekstrak daun mempunyai potensi sitotoksik yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak kulit batang. Hal ini dibuktikan dengan harga  $IC_{50}$  dari sel HeLa, T47D dan WiDR; bahwa ekstrak daun tumbuhan Sala (*C. ramiflora* Linn) mempunyai  $IC_{50}$  berturut-turut adalah 1,92; 6,37 dan 0,41  $\mu\text{g/mL}$ . Harga  $IC_{50}$  dari sel HeLa, T47D dan WiDR

ekstrak kulit batang berturut-turut adalah >1000; 0,90 dan 6,29  $\mu\text{g/mL}$

## DAFTAR PUSTAKA

- Bunyapraphatsara, Nuntavan, Jutiviboonsuk, A., Sornlek, P., Therathanathorn, W., Aksornkaew, S., Fong, Harry H.S., Pezzuto, John M., and Kosmeder, Jerry. 2003. *Pharmacological studies of plants in the mangrove forest*. India: Mahidol University.
- Cho, S.J, Valerie, H.L., Wu-Sing, S.H., Sing, K.Y., Pereira, J.P., dan Goh, S.H. 1998. Novel cytotoxic polyprenilated xanthenes from *garcinia gaundichaudii* (Guttiferae), *Tetrahedron*, 54: 10915-10924.
- Dave, R. 2006. Mangrove ecosystem of south, west Madagascar: an ecological, human impact, and subsistence value assessment. *Tropical Resources Bulletin* 25: 7-13.
- Ditjen INTAG. 1993. *Hasil penafsiran luas areal dari citra landsat MSS liputan tahun 1986-1991*. Direktorat Jenderal Inventarisasi dan Tata Guna Hutan, Departemen Kehutanan RI.
- Ditjen RLPS. 2001. *Kriteria dan standar teknis rehabilitasi wilayah pantai*. Direktorat Jenderal Rehabilitasi Lahan dan Perhutanan Sosial, Departemen Kehutanan RI.
- Djajanegara, I., dan Wahyudi, P. 2009. Pemakaian sel HeLa dalam uji sitotoksitas fraksi kloroform dan etanol ekstrak daun *annona squamosa*, *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, Vol.7., No.1, 7-11.

- Doyle, A. & Griffith, S.J.B. 2000. *Cell and tissue culture for medical research*, 49. New York: John Willey and Sons, Ltd.
- Fessenden, R.J., and Fessenden, J.S. 1994. *Organic Chemistry*, 5th Edition, Willard Grant Press, Boston.
- Haryoto. 2013. *Teknik uji hayati untuk pengembangan obat (TUHPO)*. Surakarta: Fairuz Media.
- Khan, Ali, M.A., Prasanta Paul, P., and Islam, M.T. 2006. *Phytochemical and pharmacological screening of Shingra (Cynometra ramiflora Linn., Family: Leguminosae) bark based on its traditional uses*. Department of Pharmacy Southern University.
- Loomis, T., 1978. *Essential of toxicology*, 3<sup>rd</sup> edition. Philadelphia: Lea & Febriger.
- Onrizal. 2005. Hutan mangrove selamatkan masyarakat di pesisir utara Nias dari tsunami. *Warta Konservasi Lahan Basah* 13 (2): 5-7.
- Suhendi. A., Haryoto, Indrayudha, P., Muhtadi, Azizah, T. 2013. Determination of antioxidant activity of extract polar and semipolar fraction of cynometra ramiflora Linn using DPPH assay. *Acta Pharmacie Indonesia*, Vol.1, No.1, Maret 2013.
- Tiwari. P., Rahuja. N., Kumar, R., Lakshmi, V., Srivastava, N.M., Agarwal, C.S., Raghbir, R., and Srivastava, K.A. 2008. Search for antihyperglycemic activity in few marine flora and fauna. *Indian Journal of Science and Technology*. 1 (5), p.1-5.
- Uddin, Shaikh, J., Grice Darren, I., and Tiralongo, E. 2009. Cytotoxic effects of bangladeshi medicinal plant extracts. original article. *eCAM Advance Access published August 25*, P.1-6.