

Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol Daun *Aglaiia elliptica* Blume terhadap Galur Sel Kanker Serviks (HeLa)

WAHONO SUMARYONO*, AGUNG ERU WIBOWO

Pusat Teknologi Farmasi dan Medika, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT),
Jln. MH Thamrin No. 8, Jakarta 10340.

Diterima 21 Juli 2009, Disetujui 24 Februari 2010

Abstract: Cytotoxicity tests on ethanol extract of *Aglaiia elliptica* Blume leaves and its fractions on cervical cancer cell line (HeLa) were carried out. Dried powder of *Aglaiia elliptica* leaves was extracted using ethanol and then fractionated by *n*-hexane, ethyl acetate, and butanol solvents. The cytotoxicity tests using MTT method (proliferation inhibition test) on HeLa cell lines were conducted for ethanol extract, *n*-hexane, ethyl acetate, and butanol fractions. The results showed that the ethanol extract of *Aglaiia elliptica* and its fractions have inhibition effect against HeLa cell line with IC₅₀ of 282.44 ppm, 177.64 ppm, 16.03 ppm, 211.77 ppm, 181.33 ppm for ethanol extract, *n*-hexane, ethyl acetate, butanol, and water fractions respectively.

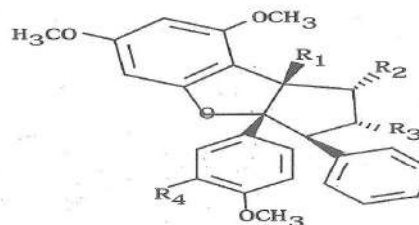
Key words: *Aglaiia elliptica* Blume, cytotoxicity, cervical cancer, cell line (HeLa), MTT, IC₅₀.

PENDAHULUAN

KANKER serviks adalah kanker yang terbentuk dalam jaringan leher rahim, yaitu jaringan yang menghubungkan uterus dengan vagina. Penyakit yang disebabkan oleh *Human Papiloma Virus* (HPV) ini biasanya tumbuh lambat (*slow growing cancer*) dan kadang tanpa gejala yang nyata, tetapi dapat diketahui dengan pemeriksaan rutin⁽¹⁾. Di Amerika Serikat (AS), data prevalensi kanker pada tahun 2007 menunjukkan bahwa sebanyak 11.150 wanita didiagnosis menderita kanker serviks dan diperkirakan sebanyak 3.670 meninggal karena penyakit tersebut⁽²⁾. Pada 2009 diperkirakan jumlah wanita AS yang mengidap kanker serviks meningkat jadi 11.270⁽¹⁾. Untuk kasus di Indonesia, data dari Rumah Sakit Kanker Dharmas (RSKD) pada periode 1998–2003 menunjukkan jumlah penderita kanker payudara hampir sama dengan kanker serviks⁽³⁾. Data dari Sistem Informasi RS (SIRS) 2007 menyebutkan bahwa kasus kanker tertinggi adalah kanker payudara diikuti oleh kanker leher rahim (serviks)⁽⁴⁾.

Laban abang (*Aglaiia elliptica* Blume) merupakan salah satu spesies dari genus *Aglaiia sp.*, famili Meliaceae. Genus *Aglaiia* merupakan sumber kelompok senyawa bahan alam unik, yaitu senyawa dengan kerangka siklopenta[b] tetrahydro-benzofuran (rokaglamid). Lebih

dari 50 senyawa turunan dari senyawa induk rokaglamid telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi^(5,6).



Gambar 1. Struktur senyawa siklopenta[b] tetrahydro-benzofuran (rokaglamid).

Bohnenstengel (2002) telah melakukan uji sitotoksitas 3 (tiga) senyawa (rokaglamid dan derivatnya) yang diisolasi dari daun dan biji *Aglaiia elliptica* Blume terhadap galur sel kanker MEL-JUSO (melanoma) dan MONO-MAC-1 (leukemia)⁽⁷⁾. Ketiga senyawa tersebut adalah senyawa siklopenta[b] tetrahydro-benzofuran dengan substitusi gugus R₁, R₂, R₃, dan R₄ seperti disajikan pada Tabel 1 berikut ini.

Tabel 1. Senyawa uji dan gugus substitusi.

Senyawa	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(1)	OH	OH	CONH ₂	H
(2)	OH	OH	CON(CH ₃) ₂	H
(3)	OH	OH	CONH(CH ₂) ₄ OH	H

* Penulis korespondensi, Hp. 021-5849042
e-mail: wahono@ceo.bppt.go.id

Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa (1), (2), dan (3) sangat efektif menghambat pertumbuhan galur sel kanker MONO-MAC-1 dengan IC_{50} berturut-turut sebesar 2,16 dan 13 ng/ml. Sementara itu, terhadap galur sel kanker MEL-JUSO nilai IC_{50} untuk ketiga senyawa tersebut berturut-turut sebesar 6, 9, dan 12 ng/ml⁽⁷⁾.

Berdasarkan uraian tersebut, telah dilakukan penelitian untuk melihat efek sitotoksik ekstrak etanol daun *Aglaia elliptica* Blume dan fraksi-fraksinya terhadap galur sel kanker serviks, HeLa (*human cervic carcinoma*).

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun *Aglaia elliptica* Blume yang diperoleh dari Kebun Raya Bogor dan galur sel kanker HeLa (*human cervic carcinoma*), MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difenil-tetrazolium bromida, Sigma), medium RPMI 1640 (Gibco), SDS (*sodium dodecyl sulphate*, Sigma), PBS pH 7,4 (*phosphate buffer saline*, Gibco) dan DMSO (dimetil sulfoksida, Sigma) yang diperoleh dari Laboratorium Kultur Sel LAPTIAB – BPPT. Alat yang digunakan adalah *laminar air flow cabinet* (Esco BSC-II), inkubator CO_2 (Memmert), *inverted microscope* Axiovert 40 CFL (Zeiss), ELISA reader Multiscan Ascent (Thermo), Hetich Zentrifugen Universal 320 R.

METODE. Ekstraksi. Sebanyak 1 kg serbuk kering daun *Aglaia elliptica* Blume dimaserasi menggunakan pelarut etanol selama 2 jam dengan pengadukan dan diulang sebanyak 3 kali. Setelah dilakukan penyaringan, filtrat dipekatkan dengan rotavapor vakum sampai diperoleh ekstrak etanol kental.

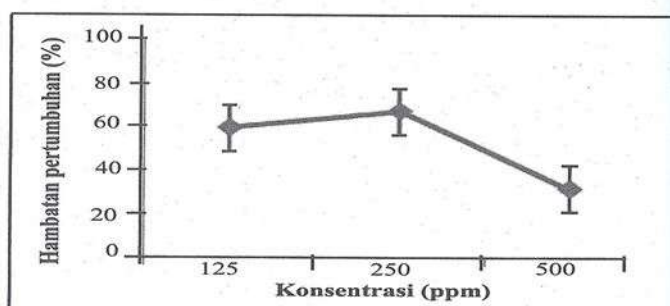
Fraksinasi ekstrak. Sebanyak 50 g ekstrak etanol kental difraksinasi dengan *n*-heksana, dilanjutkan dengan etil asetat, dan *n*-butanol. Masing-masing fraksi dievaporasi sehingga diperoleh fraksi *n*-heksana (26,8 g), etil asetat (6,8 g), *n*-butanol (2,6 g), dan fraksi air (4,0 g).

Uji hambatan pertumbuhan terhadap galur sel kanker servik (HeLa)⁽⁸⁾. Ke dalam sumur *micro plate* kultur sel dimasukkan suspensi sel (MCF-7 atau HeLa) dalam medium RPMI sebanyak 100 μ l, kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO_2 5%, suhu 37°C. Setelah 24 jam, ke dalam masing-masing sumur ditambahkan 100 μ l sampel uji dengan berbagai konsentrasi (setiap konsentrasi uji dilakukan 3 kali pengulangan/triplo). Untuk kontrol negatif ditambah 100 μ l medium kultur. Selanjutnya, *micro plate* diinkubasi selama 3 hari pada inkubator CO_2 5%, pada suhu 37°C. Setelah inkubasi selesai, ke dalam setiap sumur ditambahkan 20 μ L MTT (50 mg MTT dalam 10 ml PBS steril) dan diinkubasi selama 4 jam, kemudian ditambahkan 100 μ l SDS.

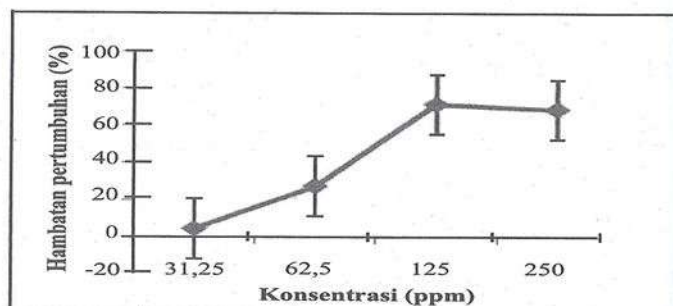
Selanjutnya dilakukan pembacaan absorbans pada panjang gelombang 570 nm. Terhadap nilai absorbans dilakukan perhitungan hambatan proliferasi dan ditentukan nilai IC_{50} .

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji hambatan proliferasi terhadap galur sel kanker serviks (HeLa). Uji ini dilakukan untuk mengetahui apakah ekstrak etanol *Aglaia elliptica* Blume dan fraksi-fraksinya dapat menghambat proliferasi galur sel kanker serviks (HeLa). Uji dilakukan dengan metode MTT. Hasil uji disajikan pada Gambar 2–6 berikut ini.

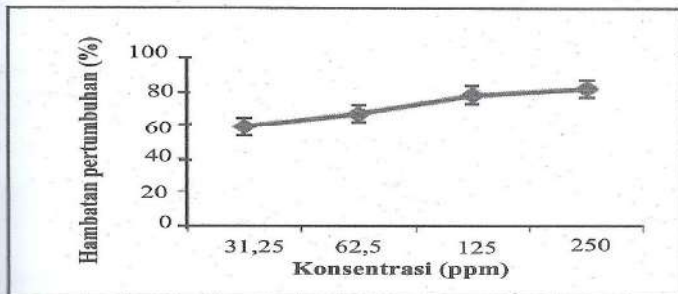


Gambar 2. Grafik hambatan pertumbuhan ekstrak etanol terhadap sel HeLa.

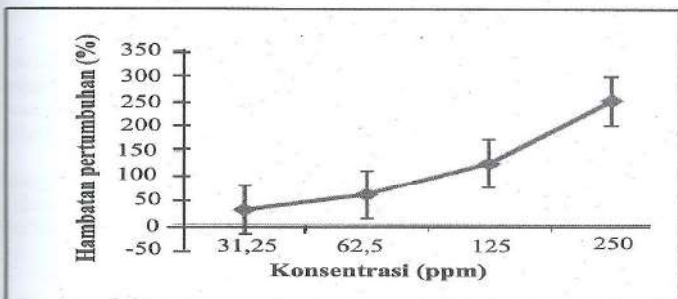


Gambar 3. Grafik hambatan pertumbuhan fraksi *n*-heksana terhadap sel HeLa.

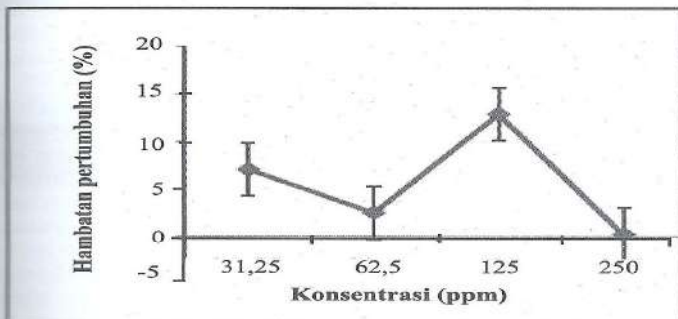
Dari gambar tersebut terlihat bahwa hasil uji untuk fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan butanol menunjukkan nilai persentase hambatan pertumbuhan terhadap sel HeLa bersifat *dose dependent*, dalam arti semakin tinggi dosis, persentase hambatan pertumbuhan semakin besar. Sementara itu, pada ekstrak etanol total dan fraksi air pola tersebut tidak terlihat. Pada ekstrak etanol total terjadi penurunan persentase hambatan pertumbuhan pada dosis 500 bpj dan pada sampel fraksi air hal tersebut terjadi secara signifikan pada dosis 250 bpj. Hal



Gambar 4. Grafik hambatan pertumbuhan fraksi etil asetat terhadap sel HeLa.



Gambar 5. Grafik hambatan pertumbuhan fraksi butanol terhadap sel HeLa.



Gambar 6. Grafik hambatan pertumbuhan fraksi air terhadap sel HeLa.

ini kemungkinan karena adanya kandungan senyawa yang justru menginduksi proliferasi sel atau senyawa yang bersifat *dual effect*, yaitu senyawa yang dapat mendorong dan menghambat proliferasi sel, tergantung besarnya konsentrasi senyawa tersebut. Hal seperti ini dilaporkan oleh Margareta, *et al.* (2006), yaitu bahwa senyawa pada digitalis bersifat *dual effect* terhadap sel HeLa. Pada konsentrasi <math><10\text{ nM}</math>, senyawa pada digitalis dapat mendorong proliferasi sel HeLa, tetapi

pada konsentrasi >math>10\text{ nM}</math>, senyawa tersebut justru mendorong kematian sel HeLa⁽⁹⁾. Dalam penelitian ini, pada ekstrak etanol total kadar senyawa yang mungkin bersifat *dual effect* relatif sedikit dihitung terhadap total senyawa dalam ekstrak, sehingga baru pada dosis 500 bpj muncul efek berlawanan, yaitu peningkatan proliferasi sel. Sedangkan pada fraksi air, kadar senyawa tersebut jauh lebih tinggi, sehingga pada dosis 250 bpj sudah memberi efek penurunan persentase hambatan pertumbuhan sel yang sangat tajam.

Kemungkinan lain yang menyebabkan hasil uji pada ekstrak etanol dan fraksi air tidak bersifat *dose dependent* adalah adanya senyawa dalam sampel uji yang memberi efek reduksi intrinsik terhadap pereaksi MTT. Dalam uji MTT perlu dihindari terjadinya reduksi senyawa MTT oleh senyawa-senyawa ekstraseluler. Senyawa antioksidan (vitamin C, vitamin E, *N*-asetilsistein), berbagai ekstrak tanaman dan senyawa fitoestrogen dapat menginduksi pembentukan formazan dari MTT meskipun tidak ada sel hidup. Tahapan pencucian sel setelah pemberian sampel uji sebelum penambahan MTT menjadi salah satu faktor penting dalam menghindari terjadinya reduksi intrinsik tersebut^(10,11). Praptiwi *et al.* (2006) melakukan penelitian tentang nilai peroksida dari ekstrak 3 spesies tanaman *Aglaiia*, yaitu *A. argentea*, *A. silvestris*, dan *A. tomentosa*. Nilai peroksida (POV) dapat digunakan untuk mengetahui sifat reduktor atau oksidator suatu ekstrak tumbuhan⁽¹²⁾. Bila ekstrak bersifat reduktor, kemungkinan ekstrak tersebut dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan. Dari penapisan fitokimia diketahui bahwa ekstrak dari ketiga tanaman tersebut mengandung sterol dan triterpen, alkaloid basa, gula pereduksi, dan antrasenoid. Nilai peroksida ekstrak dari ketiga tanaman tersebut pada umumnya lebih besar daripada nilai peroksida vitamin E (40.996 milieq/1000 g), kecuali nilai peroksida ekstrak khloroform *A. tomentosa* (41.078 milieq/1000 g). Ini berarti ekstrak khloroform tersebut mempunyai sifat sebagai antioksidan. Kandungan senyawa dalam ekstrak khloroform pada umumnya adalah golongan senyawa alkaloid dan fenol⁽¹²⁾. Dari informasi hasil penelitian tersebut, diduga ekstrak atau fraksi dari *Aglaiia elliptica* juga mempunyai efek antioksidan, sehingga ada kemungkinan terjadi reduksi intrinsik terhadap MTT.

Di samping itu, adanya senyawa kolesterol juga berpengaruh pada uji MTT, yaitu menyebabkan terjadinya penurunan reduksi MTT. Penambahan kolesterol pada kultur media sel A549 (0,1 μM selama 4 jam pada suhu 37°C) dapat menghambat pembentukan warna formazan dari MTT sekitar 35%. Bila konsentrasi kolesterol dinaikkan dari 1,0 μM ke 15,0 μM , terjadi penurunan absorbans lebih dari 50%⁽¹³⁾. Weber *et al.* (2000) melaporkan bahwa telah berhasil diisolasi 2 senyawa

turunan androstan, asam seko-17-oktanorsikloartan-cincin A, 4 senyawa sikloartan tipe triterpen, 3 senyawa turunan kolesterol, stigmastandiol, β -sitosterol dan β -D-glukosida dari ekstrak daun *Aglaia rubiginosa*⁽¹⁴⁾. Karena berada dalam satu genus, kemungkinan dalam daun *Aglaia elliptica* Blume juga terdapat senyawa seperti dalam simplisia *Aglaia rubiginosa*, termasuk senyawa kolesterol. Dengan demikian dapat diduga bahwa hasil uji MTT pada ekstrak etanol daun laban abang (*Aglaia elliptica* Blume) terpengaruh oleh sampel uji yang mengandung senyawa kolesterol, sehingga pola grafik hambatan pertumbuhan sel tidak bersifat *dose dependent*.

Dari grafik hambatan pertumbuhan sel hasil uji MTT terhadap ekstrak etanol daun laban abang (*Aglaia elliptica* Blume) dan fraksi-fraksinya, dapat dihitung nilai IC_{50} dari masing-masing fraksi seperti disajikan pada Tabel 2 berikut ini.

Tabel 2. Nilai IC_{50} ekstrak dan fraksi terhadap galur sel kanker serviks (HeLa).

Ekstrak/ fraksi	Nilai IC_{50} μ g/ml
Etanol	282,44
<i>n</i> -heksan	117,64
Etil asetat	16,03
Butanol	211,77
Air	181,33

Dari data nilai IC_{50} di atas, ternyata fraksi etil asetat mempunyai efek sitotoksik paling kuat dibandingkan ekstrak etanol total dan fraksi-fraksi lainnya. Hal ini mengindikasikan bahwa keberadaan senyawa aktif yang mempunyai efek sitotoksik ada pada fraksi etil asetat (semi polar). Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa keberadaan senyawa rokaglamid dan derivatnya terdapat dalam fraksi etil asetat⁽⁶⁾. Dengan demikian ada dugaan kuat bahwa senyawa aktif yang mempunyai efek sitotoksik terhadap sel HeLa adalah senyawa rokaglamid atau derivatnya.

SIMPULAN

Ekstrak etanol daun *Aglaia elliptica* Blume dan fraksi-fraksinya mempunyai potensi menghambat pertumbuhan galur sel kanker serviks (HeLa) dengan nilai IC_{50} ekstrak etanol 282,44 bpj; fraksi *n*-heksana 117,64 bpj; fraksi etil asetat 16,03 bpj; fraksi butanol 211,77 bpj; dan fraksi air 181,33 bpj. Fraksi etil asetat menunjukkan efek hambatan pertumbuhan paling kuat dibandingkan ekstrak etanol total dan fraksi-fraksi lainnya.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih disampaikan kepada Pusat Teknologi Farmasi dan Medika, Deputi Bidang Teknologi Agroindustri dan Bioteknologi BPPT yang telah menyediakan tempat dan fasilitas serta dukungan bahan-bahan untuk penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

1. National Cancer Institute. Cervical cancer. Diambil dari <http://www.cancer.gov/cancerinfo/types/cervical>. Diakses tanggal 23 Juni 2009.
2. Anonim. Advances in focus, cervical cancer. National Cancer Institute. Diambil dari <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/cancer-advances-in-focus/cervical>. Diakses tahun 2007.
3. Sutandyo N. Pola alur pensinyalan kanker payudara usia muda non familial: tinjauan pada alur hormonal (estrogen) dan non hormonal (IGF-IR, Her-2), [Ringkasan Disertasi]. Jakarta: Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 2006.
4. Departemen Kesehatan RI. Deteksi dini penyakit kanker. Diambil dari <http://www.depkes.go.id/index.php?option=news&task=viewarticle&sid=3081&Itemid=2>. Diakses tanggal 23 Mei 2009.
5. Proksch P. Chemistry and biological activity of rocaglamide derivatives and related compounds in *Aglaia* species (Meliaceae). *Current Organic Chemistry*. 2001.5:923-38.
6. Chaidir. Insektizide rocaglamind-derivate und verwandte verbindunge aus *Aglaia*-arten (Meliaceae) [Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktogrades der bayerischen Julius-Maximillana]. Wuerzburg: Universitat Wuerzburg; 2002. p. 64-7.
7. Bohnenstengel F. Inhaltsstoffe Austrophischen Meliaceen der gattung Aglaia und Melia, isoleurung, sturkturauffklarung und evaluierung der pharmakologisschen aktiviatenm [Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktogrades der bayerischen Julius-Maximillana]. Wuerzburg: Universitat Wuerzburg; 2000.
8. Anonim. MTT cell proliferation assay instruction catalog number 30-1010k, ATCC [serial online]. 2001. Diambil dari <http://www.atcc.org>. Diakses tanggal 25 juni 2006.
9. Margarita RO. Proliferation and apoptosis of HeLa cells induced by in vitro stimulation with digitalis (abstract). *European Journal of Pharmacology*. 2006.534(1-3).
10. Bruggisser R. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Med*. 2002.68(5):445.
11. Ewelina S. Dietary flavonoids sensitize HeLa cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Int. J. Mol. Sci*. 2008.9:56-64.
12. Praptiwi. Nilai peroksida *Aglaia argentea* Blume, *A. silvestria* (M. Roemer) Merr., dan *A. tomentosa* Teijsm. & Binn. *Biodiversitas*. 2006.7(3):242-4.

13. Ahmad S. Cholesterol interferes with the MTT assay in human epithelial-like (A549) and endothelial (HLMVE and HCAE) cells. *International Journal of Toxicology*. 2006.25(1):17-23.
14. Weber S. Phytochemical investigation of *Aglaia rubiginosa*. *J. Nat. Prod.* 2000.63:636-42.