

AKTIVITAS SITOTOKSIK DARI EKSTRAK KULIT BUAH DURIAN (*Durio zibethinus* Murr.), DAN KELENGKENG (*Dimocarpus longan* Mark.) TERHADAP SEL VERO DAN HeLa

Andi Suhendi¹, Muhtadi², Leonita Adhiyati H.³, Tanti Azizah Sudjono⁴ dan Haryoto⁵

Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta,
Jl. A. Yani Tromol Pos I Pabelan, Kartasura Surakarta 57102
Email: Andi.Suhendi@ums.ac.id

Abstrak

Kulit buah durian dan kelengkeng mengandung senyawa flavonoid, polifenol, asam galat, asam ellegat, dan saponin. Aktivitas yang ditunjukkan dari senyawa tersebut meliputi antibakteri, antioksidan, antijamur, antikolesterol, antihiperurisemia, dan sitotoksik. Tulisan ini menjelaskan tentang aktivitas sitotoksik dan IC50 dari ekstrak etanol kulit buah durian, kelengkeng dan biji kelengkeng terhadap sel Vero dan sel HeLa. Pengujian sitotoksik dilakukan secara *in vitro* menggunakan metode MTT assay. Uji aktivitas sitotoksik dilakukan dalam 7 seri kadar konsentrasi masing-masing ekstrak (1000, 850, 700, 550, 400, 250, dan 100 µg/mL). Hasil uji sitotoksik menunjukkan bahwa ekstrak etanol biji kelengkeng menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa dengan IC50 = 21.826 µg/mL sedangkan ekstrak etanol kulit kelengkeng dan durian terhadap sel HeLa tidak menunjukkan aktivitas sitotoksik. Ekstrak etanol biji kelengkeng dan kulit buah durian terhadap sel Vero menunjukkan IC50 secara berurutan 272.812 dan 1.864 µg/mL sedangkan ekstrak etanol kulit kelengkeng terhadap sel Vero tidak menunjukkan aktivitas sitotoksik. Hasil penelitian ini menunjukkan aktivitas sitotoksik yang sangat lemah dari ekstrak etanol kulit durian, kelengkeng, dan biji kelengkeng.

Kata kunci: *Durio zibethinus*; *Dimocarpus longan*; MTT assay; sel HeLa; dan sel Vero

Pendahuluan

Kanker terjadi akibat mutasi gen secara abnormal dan merusak bagian sel sehat sehingga dapat menyebabkan kematian pada pasien. Kanker kolon dan kanker serviks merupakan jenis kanker yang dapat mengakibatkan kematian dengan kejadian tertinggi di dunia. Terdapat 49.960 kematian akibat kanker kolon dan 3.870 kematian disebabkan oleh kanker serviks (Jernal et al, 2008). Pengobatan kanker serviks dengan agen kemoterapi sangat terbatas karena timbulnya masalah resistensi dan efek toksik terhadap sel normal (Tyagi et al, 2004). Beberapa penelitian mulai mengembangkan pengobatan kombinasi dari agen kemoterapi dengan agen chemopreventive salah satunya penelitian terhadap *Durio zibethinus* dan *Dimocarpus longanum* tanaman tahunan yang memiliki aktivitas antioksidan sehingga mampu menghambat proliferasi sel kanker. Kandungan kimia yang dilaporkan sebagai antikanker adalah senyawa golongan flavonoid (Annida, 2011).

Hasil penelitian pendahuluan menunjukkan kulit durian dan kelengkeng memiliki aktivitas biologis sebagai antibakteri, antioksidan, antijamur, antikolesterol, antihiperurisemia, dan sitotoksik. Penelitian Annida (2011) dan Batubara (2011) terhadap aktivitas antioksidan ekstrak etanol kulit buah durian dan kelengkeng menunjukkan nilai kadar fenolik total yang tinggi dari ekstrak etanol kulit bagian dalam dan luar durian serta kulit dan biji kelengkeng sebesar 71,75; 79,49; 464,00 ± 41,45 dan 273,87 ± 15,36 mg/g sampel, sedangkan untuk kadar flavonoid total sebesar 54,82; 135,76; 477,64 ± 2,81 dan 160,99 ± 15,89 mg/g sampel. Hasil uji toksisitas oleh Santi (2011) dengan pengujian metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) diperoleh nilai LC50 untuk ekstrak etanol 95% kulit dan biji kelengkeng sebesar 942 µg/mL dan 3429 µg/mL hal ini menunjukkan bahwa ekstrak tidak menimbulkan efek toksik terhadap sel normal.

Telah diketahui adanya korelasi positif antara aktivitas sitotoksik dan antioksidan dengan aktivitas anti kanker. Berdasarkan hal tersebut, pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas sitotoksik ekstrak etanol kulit buah durian dan kelengkeng terhadap sel Vero dan HeLa.

Metodologi Penelitian

Alat: mikroskop *inverted* (Olympus CKX41), inkubator CO₂ *Jacketed Incubator* (Nuairé™ IR autoflow), ELISA reader, *Laminar Air flow* (Labconco), *hemocytometer, counter, vortex* (Genie), timbangan elektrik (Sartorius).

Bahan: serbuk kulit buah durian dan kelengkeng, sel HeLa, sel Vero, etanol 96%, plat KLT silika gel GF 254, akuades, kloroform (p.a), methanol (p.a), reagen semprot anisaldehyd, FeCl₃, sitroborat, dan Dragendorff, media kultur (M199), media kultur (RPMI 1640), FBS 10%, NaOH 1 N atau HCl 1 N, penisilin-streptomisin (penstertp), fungizone (*amphotericin B*), akuades, natrium bikarbonat, aquabidest, PBS, larutan MTT, SDS 10% HCl 0,1N, DMSO 100%, tripsin-EDTA 1x (tripsin 0,25%).

Jalannya Penelitian

1. Ekstraksi

Simplisia kulit buah durian dan kelengkeng yang telah dibersihkan kemudian dirajang, dikeringkan, dihaluskan hingga menjadi serbuk dan siap untuk dimaserasi dengan etanol 96%. Serbuk simplisia direndam dengan etanol 96% hingga terendam sempurna, maserasi dilakukan selama 3 hari, setiap hari ekstrak diaduk. Maserat yang didapat diuapkan dengan *evaporator*, filtrat hasil maserasi diuapkan diatas waterbath hingga didapat ekstrak kental.

2. Uji Senyawa dengan KLT

Ekstrak kental dilarutkan dalam 1 mL etanol, kemudian ditotolkan pada plat KLT dan dielusi dengan fase gerak kloroform : metanol (9,5:0,5). Hasil elusi dideteksi di bawah sinar 254 nm dan 366 nm dan disemprot dengan reagen sitroborat yang diamati pada sinar UV366nm, FeCl₃ pada sinar tampak, Dragendorf dan anisaldehyd-H₂SO₄ pada sinar tampak.

3. Uji Sitotoksik

a. Pembuatan Larutan Uji

Ekstrak etanol kulit buah dibuat 7 seri kadar (1000, 850, 700, 550, 400, 250, dan 100 µg/mL) dari larutan induk dalam media RPMI untuk sel HeLa dan media M199 untuk sel Vero.

b. Uji Sitotoksik Metode MTT assay

Sel HeLa dan Vero dengan kepadatan 10.000 (10⁴)/100 µL bersama sampel uji dalam pelarut DMSO didistribusikan ke dalam *microplate* 96 dengan seri kadar diulang tiga kali kemudian diinkubasi 24 jam dalam inkubator 5% CO₂ pada suhu 37°C. Pada akhir inkubasi tiap sumuran diisi media kultur 110 µL yang mengandung MTT 5 mg/mL PBS. Diinkubasi kembali selama 4 jam pada suhu 37°C hingga terbentuk kristal formazan diamati di bawah mikroskop *inverted*, sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu. Setelah 4 jam, reaksi dihentikan dengan ditambahkan SDS 10% dalam HCl 0,01N 100 µL/sumuran. Diinkubasi selama semalam pada suhu kamar dengan ditutup aluminium foil. Hasil pengujian dibaca pada ELISA reader dengan panjang gelombang 595nm.

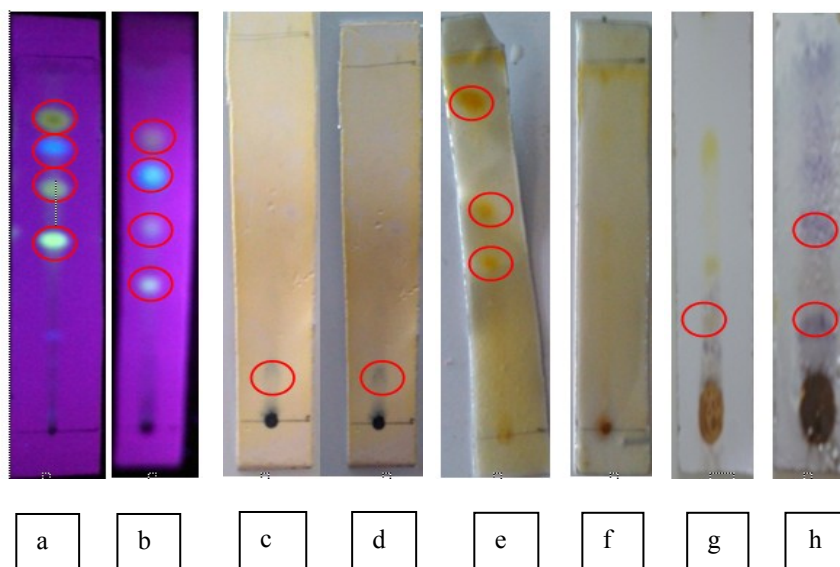
c. Analisis uji sitotoksik hasil pembacaan ELISA reader menggunakan rumus :

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{(\text{absorbansi perlakuan} - \text{absorbansi kontrol media})}{(\text{absorbansi kontrol sel} - \text{absorbansi kontrol media})} \times 100\%$$

Regresi linier antara log konsentrasi vs % sel hidup dibuat menggunakan $Y = Bx + A$, dengan Y angka probit dan X adalah log konsentrasi. Nilai probit 50% sel hidup dimasukkan ke dalam persamaan hingga diperoleh nilai IC₅₀.

Hasil dan Pembahasan

Rendemen ekstrak kulit buah durian dan kelengkeng didapatkan masing-masing sebesar sebanyak 16,93 %; 13,10 %; dan 10,09 %. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian dilakukan uji kandungan senyawa dengan metode kromatografi lapis tipis untuk mengetahui kelompok senyawa yang terkandung. Berdasarkan hasil uji, kelompok senyawa dalam kedua ekstrak tersebut mengandung flavonoid (fluoresensi hijau dibawah UV 366 nm dan setelah disemprot dengan sitroborat) (Daniel, 2010), polifenol ditunjukkan dengan timbulnya bercak abu kehitaman setelah disemprot FeCl₃ dan alkaloid ditunjukkan dengan hasil warna coklat pada saat disemprot dengan Dragendorff. Pereaksi anisaldehyd-H₂SO₄ digunakan untuk identifikasi saponin yang menunjukkan bercak biru sampai violet pada sinar tampak (Wagner & Bladt, 1995).



Gambar 1. KLT kulit durian, kulit kelengkeng, dan biji kelengkeng dengan fase gerak kloroform : metanol (9,5;0,5)

Keterangan :

Deteksi reagen semprot sitoborat pada UV₃₆₆ nm: (a) kulit durian, (b) kulit kelengkeng

Deteksi dengan FeCl₃ pada sinar tampak: (c) kulit durian, (d) kulit kelengkeng

Deteksi dengan dragendorf pada sinar tampak: (e) kulit durian, (f) kulit kelengkeng

Deteksi dengan anisaldehyd-H₂SO₄ pada sinar tampak: (g) kulit durian, (h) kulit kelengkeng

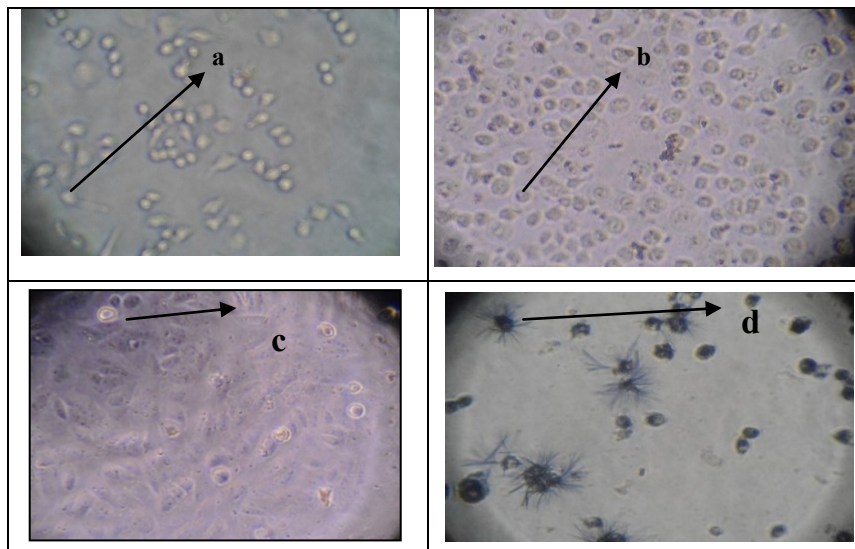
Tabel 1. Data Hasil Uji KLT Ekstrak Etanol Kulit Buah Durian dan Kelengkeng

Deteksi	Kulit durian		Kulit kelengkeng		DugaanSenyawa
	Rf	Warna	Rf	Warna	
Sitoborat UV366nm	0,46	Hijau	0,4	Hijau	Flavonoid
	0,6	Hijau	0,54	Hijau	
	0,7	Biru	0,66	Biru	
	0,8	Hijau	0,76	Hijau	
FeCl ₃ Visual	0,2	Abu-abu	0,16	Abu-abu	Polifenol
	-	-	-	-	
Dragendorff Visual	0,42	Kuning	-	-	-
	0,56	Kuning	-	-	
	0,84	Kuning	-	-	
	-	-	-	-	
Anisaldehyd-H ₂ SO ₄ Visual	0,44	Ungu	0,5	Ungu	Saponin terpenoid

Dari Tabel 1 maka dapat disimpulkan ekstrak etanol kulit buah durian dan kelengkeng mengandung senyawa flavonoid, polifenol, dan saponin terpenoid. Uji aktivitas sitotoksik dilakukan dengan metode MTT assay. Dasar pengukurannya adalah reaksi MTT [3-4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromida] oleh sistem reduktase suksinat tetrazolium pada rantai respirasi mitokondria. Hasilnya adalah terbentuk kristal formazan berupa kristal warna ungu yang larut SDS 10% (Doyle & Griffith, 2000). Fungsi larutan SDS 10% dalam HCl 0,01 M selain melarutkan kristal formazan juga untuk menghentikan reaksi enzimatis selain itu adanya HCl berguna untuk mengubah merah fenol pada medium RPMI 1640 maupun M 199 menjadi kuning sehingga merah fenol tidak mengganggu serapan formazan (Syahfan, 2005). Pembacaan absorbansi menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 500-600 nm (Mostman *et al*, 1983). Penelitian ini menggunakan sel HeLa yang merupakan turunan dari sel kanker ephitel leher rahim (*cervix*) manusia yang dikembangkan secara *in vitro* dan sel Vero merupakan sel normal yang diambil dari ginjal monyet Afrika dewasa (*Cercopithecus aethiops*).

Terdapat perbedaan morfologis sel hidup dan sel mati. Sel HeLa (Gambar 2a) sebelum perlakuan berbentuk bulat dan dikelilingi oleh membran sel yang jernih. Sel Vero (Gambar 2b) sebelum perlakuan berbentuk bulat berinti. Sel kanker tersebut setelah diperlakukan maka morfologinya berubah, terlihat tidak bulat (gambar 2c) dan

pembentukan kristal formazan setelah pemberian senyawa MTT (gambar 2d). Evaluasi aktivitas sitotoksik setiap perlakuan didasarkan nilai IC₅₀. Nilai ini diperoleh dengan membuat plot log konsentrasi perlakuan vs % sel hidup.



Gambar 2. (a) sel HeLa sebelum perlakuan, (b) sel Vero sebelum perlakuan, (c) kematian sel setelah perlakuan, (d) pembentukan kristal formazan

Tabel 2. Hasil Uji Sitotoksik

Nomor	Nama Ekstrak	Sel Uji	IC ₅₀ (µg/mL)	Keterangan
1	Kulit Durian	Sel HeLa	Tidak Terhitung	-
2	Kulit kelengkeng		Tidak Terhitung	-
3	Doksorubisin		1,590	Poten
4	Kulit Durian		1,864	Tidak Poten
5	Kulit kelengkeng	Sel Vero	Tidak Terhitung	-
6	Doksorubisin	Sel Vero	Tidak Terhitung	-

Berdasarkan hasil perhitungan yang didapatkan maka ekstrak kulit buah durian dan kelengkeng tidak menunjukkan aktivitas antikanker secara *in vitro*. Pertamawati (2007) menyebutkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak yang diberikan serta semakin lama masa inkubasi maka akan meningkatkan persentase daya hambat pertumbuhan sel HeLa, namun karena beragamnya karakteristik sel kanker dan beragam pula mekanisme kerja senyawa antikanker yang terkandung dalam suatu ekstrak maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui konsentrasi yang tepat dari masing – masing ekstrak dan waktu inkubasi yang optimal dalam menghambat pertumbuhan sel HeLa (Erna, *et al.*, 2011).

Hasil IC₅₀ yang rendah juga ditunjukkan dari percobaan Balgish (2013) terhadap sel T47D dengan nilai sebesar 705,67 dan 340,25 serta pada sel WiDr sebesar 291,80; dan 268,22; µg/mL. Penelitian sebelumnya oleh Gorinstein, *et al.*, (2011) juga menunjukkan aktivitas antiproliferasi yang sangat lemah dari ekstrak metanol buah durian pada konsentrasi 2000 µg/mL dari buah durian yang telah matang terhadap sel Calu-6 dan SNU-601 sebesar 86,8 ± 1,% dan 88,5% ± 2,5%. Pada hasil uji terhadap sel Vero menunjukkan hasil yang sesuai dengan hasil uji toksisitas oleh Santi (2011) dengan pengujian metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) diperoleh nilai LC₅₀ untuk ekstrak etanol 95% kulit dan biji kelengkeng sebesar 942 µg/mL dan 3429 µg/mL. Suatu zat dikatakan aktif atau toksik bila nilai LC₅₀ < 1000 µg/mL sehingga disimpulkan tidak adanya efek toksik terhadap sel normal.

Kesimpulan dan Saran

Kesimpulan

Berdasarkan data percobaan yang didapat dapat disimpulkan bahwa:

1. Ekstrak etanol kulit buah durian dan kelengkeng tidak menunjukkan potensi aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa dan tidak toksik terhadap sel Vero.
2. Ekstrak etanol kulit durian dan kelengkeng mengandung senyawa polifenol, flavonoid, dan saponin terpenoid.
3. Nilai IC₅₀ ekstrak etanol biji kelengkeng dan kulit buah durian terhadap sel Vero berturut-turut adalah 272.812 dan 1.864 µg/mL, dan untuk ekstrak etanol kulit buah durian terhadap sel HeLa dan kulit kelengkeng terhadap sel HeLa maupun sel Vero tidak dapat ditentukan.

Saran

Berdasarkan kesimpulan 1 dan 3 maka penelitian kulit buah durian, kelengkeng, dan biji kelengkeng tidak dapat dilanjutkan untuk berbagai aktivitas sitotoksik lainnya. Uji aktivitas dilanjutkan kearah penyakit degeneratif karena secara empiris sudah ada penggunaannya.

Daftar Pustaka

- Annida, R., (2011), Korelasi Aktivitas Antioksidan dengan Kadar Fenolik dan Flavonoid Total Ekstrak Etanol Kulit dan Biji Kelengkeng Lokal (*Euphoria longan* Lour. Steud) Beserta Fraksi-Fraksinya, *Skripsi*, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta
- Balgish, (2013), Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol Kulit buah Durian (*Durio zibethinus* Murr.) Dan Kelengkeng (*Dimocarpus longan* Mark.) Terhadap Sel T47D dan WiDr, *Skripsi*, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta
- Batubara, R. W., (2011), Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kulit Buah Durian (*Durio zibethinus* Murr.) Lokal dan Fraksi-Fraksinya dengan Metode DPPH serta Penetapan Kadar Fenolik dan Flavonoid Totalnya, *Skripsi*, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta
- CCRC, (2013), *Cancer Chemoprevention Research Center*, Yogyakarta, Fakultas Farmasi UGM
- Childs, A. C., Phaneuf, S. L., Dirk, A. J., Phillips, T. & Leeuwenburgh, (2002), Doxorubicin Treatment *in Vivo* Cause Cytochrome Release and Cardiomyocyte Apoptosis, As Well As Increased Mitochondrial Efficiency, Superoxide Dismutase Activity, and Bcl-2:Bax Ratio, *Cancer research*, 62, 4592-4598
- Da'i, M., Anis, F., & Edy, M., (2007), Efek Sitotoksik Ekstrak Tanaman Keladi Tikus (*Typhonium divaricatum* (L.)) Terhadap Sel HeLa, *Jurnal Farmasi Indonesia*, 3 (4), 163-167
- Daniel, (2010), Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Pada Fraksi Etil Asetat Dari Daun Tumbuhan Sirih Merah (*Piper crocatum* Riuz & Pav), *Mulawarman Scientifie*, 9, 1
- Doyle, A. & Griffith, S.J.B., (2000), *Cell and Tissue Culture for Medical Research*, John Willey and Sons, Ltd, New York
- Ermin, R., Setyowati, K., Hidayat, S., (2012), Efek Ekstrak Etanolik Daun Sirsak pada Proliferasi dan Apoptosis Sel HeLa yang Dimediasi oleh P53, *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 27 (1), 28-33
- Ernawati, S., Suprihatin., Ida, W., (2011), Perbandingan Daya sitotoksik Ekstrak Rimpang 3 Jenis Tumbuhan *Zingiberaceae* Terhadap Sel Kanker MCF-7, *Jurnal Farmasi Indonesia*, 5 (3), 125-133
- Gorinstein, S., Ratiporn, H., Sumitra, P., Suchada, V., Jacek, N., Magda, S. K., Yong-Seo, P., Buk-Gu, H., Ja-Yong, C., & Hong Gi jan, (2011), Comparison Of Bioactive Compounds, Antioxidant, and Antiproliferative Activities Of Mon-Thong Durian Durian Ripening, *Food Chemistry*, 118, 540-547
- Huang, G. J., Wang, B. S., Lin, W. C., Huang, S. S., Lee, C. Y., Yen, M. T. *et al.*, (2012), Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Longan (*Dimocarpus longan* Lour.) Pericarp. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Smigal, C., & Thun, M.J., (2008), Cancerstatistics, *Cancer J. Clin*, 56 (2), 106-130
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G. & Gianni, L., (2004), Anthra Cyclins: Molecular Advances and Pharmacologic Development in Antitumor Activity and Cardiotoxicity, *Pharmacol Rev*, 56, 185-228
- Mosmann, T., (1983), Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assay, *Journal of Immunological Methods*
- Meyer, B. N., ferrigni, N.R., Putnam, J. E., Jacobson, L.B., Nicholas, D.E., McLaughlin, J.L., Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay For Active Plant Constituent, *Plant. Med*, 31, 34-45
- Pertamawati, (2007), Pengaruh Sitotoksik ekstrak Buah Mahkotadewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl) Terhadap sel Kanker Lestari HeLa, *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia*, 9 (1), 39-40
- Santi, R. N., (2011), Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit dan Kelengkeng (*Euphoria longan* (Lour) Steud) terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* serta Toksisitasnya terhadap *Artemia salina* Leach, *Skripsi*, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta
- Syafhan, N. F., (2005), Uji Sitotoksitas Sediaan Jadi Daging Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boert) terhadap Sel MCF-7 (sel kanker payudara) secara *in vitro*, *Skripsi*, Jakarta, Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia
- Syamsudin, & Brata, C. W., (2008), Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Kulit Batang Asam Kandis (*Garcinia parvifolia* (Miq)Miq) Pada Sel Vero Dan Sel HeLa, *Jurnal Bahan Alam Indonesia*, 6 (5), 201-205
- Tyagi AK, Agarwal C, Chan DCF, Agarwal R., (2004), *Oncology Reports*, 11, 493-499
- Wagner, H. & Bladt, S., (1996), *Plant Drug Analysis : A Thin Layer Chromatography Atlas*, second edition, Springer-Verlag, Berlin