

Sitotoksitas Ekstrak Etanolik Kulit Batang dan Daun Tumbuhan Sala (*Cynometra ramiflora* Linn)

Haryoto^{1a}, Muhtadi^a, Tanti Azizah^a, Peni Indrayudha^a dan Andi Suhendi^a

^aFakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah, Surakarta

Abstrak

Tumbuhan Sala yang dikenal dengan nama latin *Cynometra ramiflora* Linn, di dalam Kraton Kasunanan Surakarta sering digunakan sebagai obat asam urat, diabetes, hipertensi dan penyakit lainnya. Selain kegunaan tersebut tumbuhan ini juga dimanfaatkan sebagai obat antikanker. Untuk pembuktian ini perlu dilakukan percobaan dan analisis ekstrak etanolik kulit batang dan daun tumbuhan Sala terhadap beberapa sel kanker. Efek sitotoksitas ekstrak etanolik tumbuhan Sala (*C. ramiflora* Linn) terhadap sel kanker dilakukan dengan menggunakan ekstrak dari bagian tumbuhan yaitu kulit batang dan daun. Sitotoksitas ekstrak etanolik tumbuhan Sala (*C. ramiflora* Linn) dianalisis dengan tiga jenis sel kanker yaitu sel HeLa, T47D dan WiDR. Kadar IC_{50} dihitung dari hasil pengamatan banyaknya persentase sel mati yang diinkubasi selama 24 jam dengan penambahan ekstrak. Setelah dilakukan percobaan sitotoksitas ekstrak etanolik tumbuhan Sala terhadap sel HeLa, T47D dan WiDR memberikan hasil sebagai berikut: IC_{50} kulit batang berturut-turut >1000; 0,90 dan 6,29 $\mu\text{g/mL}$. Sedangkan daun tumbuhan Sala mempunyai IC_{50} berturut-turut 1,92; 6,37 dan 0,41 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrak kulit batang tumbuhan Sala (*C. ramiflora* Linn) mempunyai IC_{50} lebih tinggi dari ekstrak daun. Data tersebut menunjukkan sitotoksitas ekstrak kulit batang terhadap tiga jenis sel kanker di atas lebih rendah dibandingkan dengan ekstrak daun.

Kata Kunci: *Cynometra ramiflora* Linn, kulit batang, daun, sitotoksitas, sel kanker.

Abstract

Sala, which is known as *Cynometra ramiflora* Linn, is often used in Kraton Kasunanan Surakarta as a medicine of uric acid, diabet, hypertension, etc. Besides that, it is also used as anticancer. In order to proof it, an experiment and analysis of ethanol extract of Sala bark and leaves is needed towards several cancer cells. Cytotoxicity of Sala ethanol extract (*C. ramiflora* Linn) towards cancer cells was conducted by using the extract of bark and leaves. Cytotoxicity of ethanol extract was analyzed by using three kinds of cancer cells, HeLa, T47D and WiDR. IC_{50} values were counted from the observation of the dead cells percentage which had been incubated for 24 hours with extract addition. The IC_{50} values of Sala bark were >1000; 0,90 and 6,29 $\mu\text{g/mL}$, respectively. In the other side, the IC_{50} values of Sala leaves were 1,92; 6,37 and 0,41 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The IC_{50} values of bark extract were higher than leaves extract. The data showed the cytotoxicity of bark extract towards three kinds of cancer cells were lower than leaves extract.

Keywords: *Cynometra ramiflora* Linn, bark, leaves, cytotoxicity, cancer cells.

1. Pendahuluan

Indonesia merupakan Negara kepulauan yang memiliki hutan mangrove terluas di dunia. Hutan mangrove dunia dilaporkan 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 dilaporkan seluas 3.735.250 ha [1]. 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 dan menjadi salah satu pusat dari isu lingkungan global. Konversi hutan mangrove terus meningkat untuk dijadikan lahan pertanian atau tambak ikan/udang, sehingga menyebabkan penurunan produktivitas ekosistem tersebut [2-4]. Dalam kurun waktu 25 tahun, hutan mangrove dunia hilang sebesar 35% dan hutan mangrove Indonesia yang rusak mencapai 57,6% [5].

Di lingkungan area Kraton Kasunanan Surakarta Hadiningrat sebelum didirikan bangunan kraton merupakan daerah rawa yang luas dan memiliki berbagai macam jenis tumbuhan. Salah satu tumbuhan mangrove yang ada di area lingkungan Keraton Surakarta Hadiningrat, Surakarta, Jawa Tengah adalah tumbuhan Sala yang 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 farmakologisnya. Padahal berdasarkan pengalaman empiris, ekstrak air (godogan) dari daun dan batang tumbuhan Sala dapat digunakan untuk membantu penyembuhan berbagai penyakit seperti

¹Alamat korespondensi: haryo62@gmail.com

hipertensi, diabetes, asam urat dan kolesterol. Oleh karena itu, penting untuk dilakukan kajian tentang penyelidikan kandungan kimia, efek farmakologi, toksisitas dan formulasinya untuk dimanfaatkan menjadi obat herbal terstandar atau ramuan jamu yang memiliki landasan ilmiah yang kuat (*scientific based*). Hasil penelitian sebelumnya menyatakan bahwa tumbuhan *Cynometra ram.flora* Linn dari beberapa Negara berpotensi sebagai antibakteri, antioksidan, antidiabetes, aktif terhadap beberapa sel uji kanker, seperti *human gastric, colon* dan *breast cancer cell lines* [6-9].

Kanker merupakan istilah umum untuk kelompok besar penyakit yang dapat mempengaruhi setiap bagian dari tubuh [10]. Kanker ialah suatu penyakit sel dengan ciri gangguan atau kegagalan mekanisme pengatur multiplikasi dan fungsi homeostatis lainnya pada organisme multiseluler.

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 mensensimal misalnya fibrosarkoma, limposarkoma, osteosarkoma. Sedangkan karsinoma bersifat epitelial sebagai contoh kanker payudara, kanker lambung, kanker uterus, kanker kulit.

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. Nilai IC_{50} dapat menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai sitotoksik. Semakin besar harga IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik.

Akhir dari uji sitotoksik dapat memberikan informasi yang maksimum yang masih memungkinkan sel mampu bertahan hidup. Akhir dari uji sitotoksitas pada organ target memberikan informasi langsung tentang perubahan yang terjadi pada fungsi sel secara spesifik [11].

2. Metode Penelitian

2.1 Bahan Tumbuhan

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

2.2 Ekstraksi

Ekstraksi dari kulit batang dan daun tumbuhan Sala (*Cynometra ram.flora* 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 didapatkan larutan. Larutan yang diperoleh selanjutnya di evaporasi sampai kental yang disebut dengan ekstrak.

2.3 Persiapan Sel kanker

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 CO₂.

2.4 Uji Sitotoksik dengan Metode MTT

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 CO₂ 5%. Diakhir 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 CO₂ 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-2il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid) membentuk formazan yang berwarna ungu. Reaksi pembentukan formazan

dihentikan dengan larutan SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*) 10% dalam HCl 0,01N, kemudian diinkubasi selama semalam pada suhu kamar. Pada akhir masa inkubasi serapan dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 550 nm. Persentase sel hidup dihitung dari data absorbansi sel kemudian dibuat kurva hubungan log konsentrasi *versus* nilai % sel hidup dan dihitung harga IC_{50} nya.

3. 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 system reduktase suksinat tetrazolium yang terdapat dalam mitokondria sel hidup [12]. 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 pelarutnya, oleh karena itu dicari pelarut yang optimal dalam melarutkan sampel ekstrak. Pelarut yang dipilih dalam penelitian ini adalah DMSO karena dapat melarutkan ion anorganik dan organik. Menurut Djajanegara dan Wahyudi DMSO tidak toksik terhadap sel kanker. Kontrol DMSO yang digunakan adalah konsentrasi DMSO yang tertinggi yang digunakan untuk melarutkan sampel [11].

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_{50} merupakan konsentrasi dimana pada konsentrasi itu dapat mematikan setengah dari sel kanker. Besarnya potensi sitotoksik digambarkan oleh kecilnya nilai IC_{50} .

Preparasi sampel dilakukan dengan melarutkan fraksi dalam dimetil sulfoksida (DMSO) yakni pada kadar 250 $\mu\text{g/mL}$ dengan DMSO 0,3%. Penggunaan DMSO dikarenakan mampu melarutkan ion organik dan anorganik. Pada penelitian terdahulu penggunaan DMSO sampai konsentrasi 1,67% v/v tidak mempengaruhi viabilitas sel T47D. Sampel selanjutnya di-*treatment* larutan uji dengan 5 konsentrasi. Dalam memudahkan pengamatan digunakan reagen MTT (*3-(4,5-dimethyliazol-2-yl)-2,5-diphenil tetrazolium 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. Sehingga, 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%.

Penambahan SDS sebagai larutan *Stocper* 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_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
	Ekstrak Daun	Ekstrak Kulit Batang
Sel HeLa	1,92	>1000
Sel T47D	6,37	0,90
Sel WiDR	0,41	6,29

4. Simpulan

Aktivitas sitotoksik ekstrak etanolik tumbuhan Sala (*C.ram.flora* 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.ram.flora* 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 $\mu\text{g/mL}$.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih dihaturkan kepada GBPH. Poeger yang telah mengizinkan dan membantu koleksi tumbuhan untuk penelitian ini. Ibu Rumbi staf Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM yang telah membantu uji sitotoksik terhadap sel kanker.

Referensi

- [1] Ditjen INTAG, "Hasil pencafsiran luas areal dari citra landsat MSS liputan tahun 1986-1991", Direktorat Jenderal Inventarisasi dan Tata Guna Hutan, Departemen Kehutanan RI, 2006.
- [2] Onrizal, "Hutan mangrove selamatkan masyarakat di pesisir utara Nias dari tsunami", *Warta Konservasi Lahan Basah*, vol.13, no. 2, hal. 5-7, 2005.
- [3] R. Dave, "Mangrove ecosystem of south, west Madagascar: an ecological, human impact, and subsistence value assessment", *Tropical Resources Bulletin*, vol.25, hal. 7-13, 2006.
- [4] JH. Primavera, "Mangroves, fishpond and the quest for sustainability", *Science*, vol. 310. no. 5745, hal. 57-58, 2005.
- [5] Ditjen RLPS, "Kriteria dan standar teknis rehabilitasi wilayah pantai", Direktorat Jenderal Rehabilitasi Lahan dan Perhutanan Sosial, Departemen Kehutanan RI, 2001.
- [6] Khan, M. A. Ali, P. Paul dan M. T. Islam, "Phytochemical and pharmacological screening of *Shingra* (*Cynometra ramiflora* Linn., Family: Leguminosae) bark based on its traditional uses", Department of Pharmacy Southern University, 2006.
- [7] Bunyapraphatsara, Nuntavan, A. Jutiviboonsuk, P. Sornlek, W. Therathanathorn, S. Aksornkaew, H. H. S. Fong, J. M. Pezzuto dan J. Kosmeder, "Pharmacological studies of plants in the mangrove forest", Mahidol University, India, 2003.
- [8] P. Tiwari, N. Rahuja, R. Kumar, V. Lakshmi, N. M. Srivastava, C. S. Agarwal, R. Raghbir dan K. A. Srivastava, "Search for antihyperglycemic activity in few marine flora and fauna", *Indian Journal of Science and Technology*. Vol. 1 no. 5, hal. 1-5, 2008.
- [9] Uddin, J. Shaikh, I. G. Darren dan E. Tiralongo, "Cytotoxic Effects of Bangladeshi Medicinal Plant Extracts", *eCAM Advance Access published*, vol. 25, hal.1-6, 2009.
- [10] Anonim, "Antiangiogenesis of Protein Fraction Containing MJ-C, Acidic Ribosome Inactivating Proteins of *Mirabilis jalapa* L", *Jurnal Bahan Alam Indonesia*, vol. 7, no 5, 2011.
- [11] I. Djajanegara, dan P. Wahyudi, "Pemakaian Sel HeLa dalam Uji Sitotoksitas Fraksi Kloroform dan Etanol Ekstrak Daun *Annona squamosa*", *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, vol.7, no. 1, hal. 7-11, 2009.
- [12] A. Doyle dan S. J. B. Griffith, "Cell and Tissue Culture for Medical Research", John Willey and Sons, Ltd, New York, 2000.