

Analisis Kandungan Senyawa Kimia dan Uji Antikanker Ekstrak Etanolik Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) pada Sel Kanker Serviks HeLa

Rifki Febriansah*, Hanik Chafidhoturrofiah, Miftah Rizkiani

Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan
Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

*Corresponding author email : briansyah_rifki@yahoo.com

ABSTRAK

Kanker merupakan penyakit yang insidensinya semakin meningkat dari tahun ke tahun. Pengobatan kanker menggunakan kemoterapi memberikan banyak efek samping, terutama pada sel normal. Hal ini menyebabkan banyak dikembangkan produk bahan alam yang relatif aman dan berkhasiat khemopreventif. Salah satu bahan alam yang dapat digunakan sebagai agen antikanker payudara adalah buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). Buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dipercaya mengandung tiga senyawa penting yang berperan dalam pengatasan kanker, yakni damnachantal, proxeronine dan alzarin yang mampu menghambat perkembangan sel kanker.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak etanolik buah mengkudu dalam menurunkan insidensi penyakit kanker serviks dengan melihat harga IC₅₀. Ekstrak ini diujikan pada sel kanker serviks HeLa. Uji sitotoksik dilakukan dengan metode MTT untuk memperoleh nilai IC₅₀. Variasi dosis yang diujikan adalah sebesar 100; 500; 250; 125; 62.5; 31.25; 15.625 µg/ml. Hasil penelitian menunjukkan nilai IC₅₀ ekstrak etanolik buah mengkudu yang rendah yaitu 4.094 µg/ml. Kesimpulan dari penelitian ini adalah bahwa ekstrak etanolik buah mengkudu memiliki potensi sebagai agen kemopreventif melalui mekanisme sitotoksik terhadap sel kanker serviks HeLa namun dengan dosis yang cukup besar.

Kata kunci : *Morinda citrifolia* L., kanker serviks, Uji sitotoksik

ABSTRACT

Cancer is a high-incidence disease in the world. Chemotherapy as a medicine to threat a cancer makes many side effect, especially for normal cell. This case makes many herbs is developed as a chemo preventive. The one of the herbs that can be used for anti cancer is noni's fruit (*Morinda citrifolia* L.). Noni's fruit contain of three important substances that can be used as anti cancer. There are damnachantal, proxeronine and alizarin. They can inhibit a growth of cancer cell.

The purpose of the research is to evaluate the effects of noni's fruit ethanolic extract as chemopreventive agent for cervical cancer by inhibit cell proliferation. Cytotoxic assay was done by MTT method to get IC₅₀ value. Dose variations was be tested in 100; 500; 250; 125;

62.5; 31.25; 15.625 µg/ml.

The result showed that IC₅₀ value of noni's fruit ethanolic extract was low. The conclusion is noni's fruit ethanolic extract having potency to againts cervical cancer HeLa cell by cytotoxic mechanism in a high dose.

Keywords : *Morinda citrifolia* L., cervical cancer, cytotoxicity assay

PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyakit yang insidensinya semakin meningkat dari tahun ke tahun. Kanker serviks merupakan penyebab kematian ketiga akibat kanker di Amerika Serikat (*National Cancer Institute*, 2010). Pengobatan kanker menggunakan kemoterapi memberikan banyak efek samping, terutama pada sel normal. Efikasi agen kemoterapi juga diturunkan dengan adanya resistensi sel kanker (*multi drug resistance mechanism*). Untuk itu dikembangkan penelitian tentang penggunaan senyawa yang berasal dari alam sebagai agen kemoprevensi yang berpotensi sebagai agen pendamping kemoterapi. Agen kemoprevensi dimaksudkan untuk meningkatkan sensitivitas sel kanker dan mengurangi efek samping akibat agen kemoterapi. Agen kemoprevensi umumnya memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan tumor melalui mekanisme *cell cycle arrest*, pemacuan apoptosis (Fisher, 1994) ataupun menghambat ekspresi protein yang berperan dalam *Multi Drug Resistance* (Kitagawa, 2006).

Salah satu bahan alam yang dapat digunakan sebagai agen antikanker payudara adalah buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). Buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dipercaya mengandung tiga senyawa penting yang berperan dalam pengatasan kanker, yakni damnachantal, proxeronine dan alzarin yang mampu menghambat perkembangan sel kanker. Damnachantal memiliki efek antitoksik, dalam hal ini sebagai antikanker dan juga sebagai antibiotik alami sehingga mampu menjaga organ tubuh yang belum terserang kanker untuk menolak kanker, sedangkan proxeronine berfungsi untuk meregenerasi sel yang rusak pada organ yang hancur karena kanker sehingga pulih kembali dan alizarin berfungsi sebagai pemutus hubungan pembuluh darah dan nutrisi ke sel kanker atau tumor dan menyebabkan jaringan kanker akan kering / luruh kemudian mati.

Dalam penelitian ini akan diuji apakah ekstrak buah Mengkudu mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker Serviks HeLa. HeLa merupakan sel kanker serviks yang diambil dari pasien kanker wanita berusia 76 tahun dan dikembangkan menjadi sel uji. Pengujian yang akan dilakukan adalah identifikasi kandungan senyawa kimia dan uji sitotoksik dari ekstrak tersebut pada sel kanker serviks.

METODOLOGI

Bahan

Ekstrak etanolik buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) yang tumbuh di daerah Kotagede, Yogyakarta. *Sel kanker serviks*. Digunakan jenis HeLa, diperoleh dari Prof. Tatsuo Takeya (Nara Institute of Science and Technology, Jepang) melalui Prof. Dr. Edy Meiyanto, M.Si, Apt.

Media. Sel HeLa ditumbuhkan pada media *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) yang mengandung *Foetal Bovine Serum* (FBS) 10% (v/v) (Gibco), penisillin-streptomisin 1% (v/v) (Gibco). *Larutan pencuci Phosphat Buffer Saline* (PBS). *Pelarut.* Digunakan dimetil sulfoksida (DMSO) untuk preparasi larutan uji dengan konsentrasi tidak lebih dari 0,2% . *Reagen MTT.* MTT [3-(4,5-dimetil thiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida] 5 mg/ml dalam media kultur. *Reagen stopper* sodium dodesil sulfat (SDS) dalam HCl 0,1%. Selain bahan-bahan di atas juga digunakan Tripsin-EDTA untuk membantu melepas sel yang melekat pada *flask* maupun *plate*.

Alat

Alat-alat gelas, flakon, timbangan analitik (Sartorius), eppendorf (Brand), vorteks, autoklaf (Hirayama), inkubator CO₂ (Heraceus), *Laminar Air Flow Hood* (Labconco), *tissue culture flask* (Nunc), tabung konikal 15 ml steril (Falcon), sentrifus (Sorvall), haemositometer (Nebauer), *cell counter*, *yellow tip* (Brand), *blue tip* (Brand), mikropipet (Gilson), mikroskop inverted (Zeiss), *96-well plate* (Nunc), *shaker* (Gemmy), *ELISA reader* (Bio-Rad), *24-well plate* (Nunc).

Jalannya Penelitian

Sterilisasi alat

Semua alat yang akan dipakai dicuci dengan menggunakan sabun dan dikeringkan, kemudian disterilkan dalam autoklaf selama 20 menit pada suhu 121°C, dengan tekanan 15 lb lalu dikeringkan dalam oven.

Pengerjaan dilakukan secara aseptis dalam *Laminar Air Flow Hood* (LAF) yang telah disterilisasi dengan sinar UV selama 30 menit, disemprot etanol 70% dan dilap.

Pembuatan larutan media dan media kultur

Larutan RPMI dibuat dengan melarutkan RPMI dalam aquades, ditambah 2,0 gram NaHCO₃ dan 2,0 gram Hepes. Larutan selanjutnya distirer sampai homogen kemudian dibuffer dengan HCl encer 1N hingga pH 7,2-7,4 diukur dengan pH meter. Selanjutnya larutan disaring dengan filter polietilensulfon steril 0,2 µm secara aseptis. Media kultur dibuat dengan cara mencampurkan larutan RPMI steril dengan FBS 10%, dan penisilin-streptomisin 1% secara aseptis di dalam LAF.

Preparasi sel

Sel yang inaktif dalam ampul diambil dari tangki nitrogen cair, segera dicairkan pada suhu 37°C, kemudian ampul disemprot dengan etanol 70%. Ampul dibuka dan sel dipindahkan ke dalam tabung konikal steril berisi media kultur. Suspensi sel disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit, supernatan dibuang, pellet ditambah 1 ml media penumbuh yang mengandung 10% FBS, resuspensi perlahan hingga homogen, selanjutnya sel ditumbuhkan dalam beberapa *tissue culture flask* kecil, diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C dengan

aliran 5% CO₂. setelah 24 jam, media diganti dan sel ditumbuhkan lagi hingga konfluen dan jumlahnya cukup untuk penelitian.

Panen sel

Setelah jumlah sel cukup, media dibuang dan sel dicuci koloninya dengan jalan penambahan larutan PBS dan jika perlu resuspensikan perlahan, buang larutan tersebut, tambahkan larutan 1 ml tripsin 2,5% pada sel, namun agar merata ditambah 3 ml larutan PBS, diamkan selama 3-5 menit agar tripsin bekerja dengan baik. Sel dipindah ke dalam tabung konikal steril dan ditambah PBS sampai volume 10 ml dan disentrifugasi pada 3000 rpm selama 3 menit. Sel dicuci dua kali menggunakan media yang sama dan dihitung jumlah selnya menggunakan haemositometer. Suspensi sel ditambah jumlah media kultur sehingga diperoleh konsentrasi sel sebesar 5x10³ sel/100 µl dan siap digunakan untuk penelitian.

Pembuatan larutan uji

Ekstrak etanolik buah Mengkudu dibuat stok dengan kadar 2x10⁵ µg/ml dalam DMSO. Selanjutnya dari larutan stok tersebut dibuat seri konsentrasi dalam media kultur.

Uji sitotoksitas menggunakan metode MTT (Mosmann, 1983)

Sel dengan kepadatan 5x10³ sel/sumuran didistribusikan ke dalam *plate* 96 sumuran dan diinkubasi selama 48 jam untuk beradaptasi dan menempel di dasar sumuran. Keesokannya media diambil, dicuci PBS kemudian ditambahkan 100 µL media kultur yang mengandung DMSO 0,2% saja (kontrol) atau sampel uji dalam bentuk tunggal (Ekstrak etanolik buah Mengkudu) diinkubasi selama 48 jam. Pada akhir inkubasi, media kultur yang mengandung sampel dibuang, dicuci dengan 100 µL PBS. Kemudian ke dalam masing-masing sumuran ditambahkan 100 µL media kultur yang mengandung 5 mg/ml MTT, inkubasi lagi selama 4 jam pada suhu 37°C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan berwarna ungu. Setelah 4 jam, media yang mengandung MTT dibuang, dicuci PBS kemudian ditambahkan larutan *stopper* SDS dalam HCl 0,1% 200 µL untuk melarutkan kristal formazan. Digoyang di atas *shaker* selama 10 menit kemudian dibaca dengan dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm.

Analisis dan Pengolahan Data

Data yang diperoleh berupa absorbansi masing-masing sumuran dikonversi ke dalam persen sel hidup dan dianalisis dengan statistik, menggunakan metode uji korelasi yang diikuti dengan uji signifikansi untuk mengetahui signifikansi perbedaan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Persen sel hidup dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{Hidup} = \frac{\text{AbsorbansiSelDenganPerlakuan} - \text{AbsorbansiKontrolMedia}}{\text{AbsorbansiKontrolSel} - \text{AbsorbansiKontrolMedia}} \times 100\%$$

Dari data % sel hidup dan log konsentrasi dihitung nilai IC₅₀ menggunakan analisis probit (SPSS 14.0) untuk mengetahui potensi sitotoksitasnya. Nilai IC₅₀ adalah konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% populasi sel, digunakan sebagai parameter sitotoksik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembuatan Ekstrak dan Analisis Kimia

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan menyari 750 gram simplisia mengkudu dengan etanol 70% sehingga diperoleh ekstrak kental sebanyak 64 gram. Buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dipercaya mengandung tiga senyawa penting yang berperan dalam pengatasan kanker, yakni damnachantal, proxeronine dan alzarin yang mampu menghambat perkembangan sel kanker.

Uji Sitotoksitas terhadap sel Hela

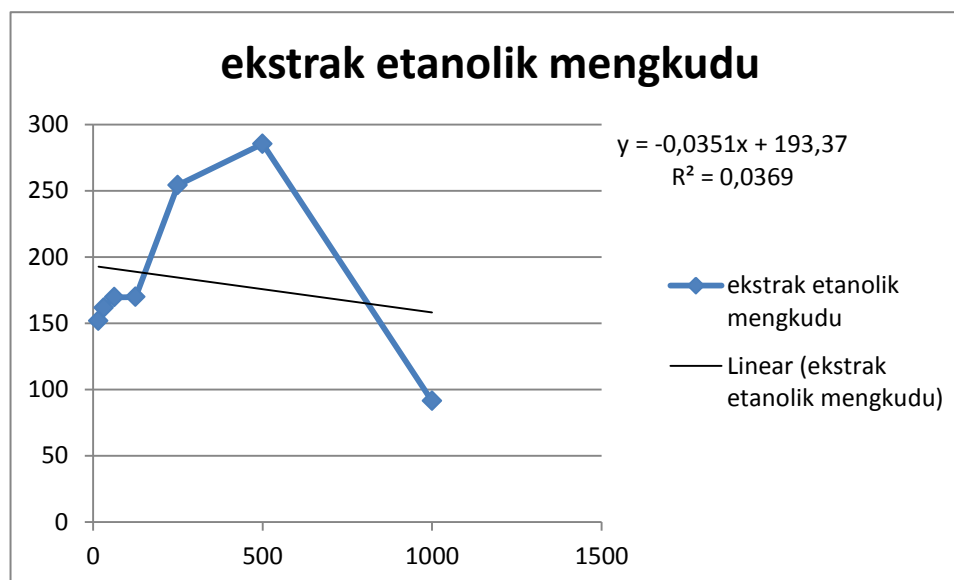
Uji sitotoksik merupakan salah satu pengembangan metode untuk memprediksi keberadaan senyawa yang bersifat toksik pada sel (Kurnijasanti *et al*, 2008). Salah satu metode yang digunakan untuk uji sitotoksik adalah MTT *assay*. Metode ini merupakan pengembangan dari metode Tada *et al*, (1986) dengan cara menghitung absorbansi sel hidup menggunakan colorimetric assay MTT. Reaksi MTT merupakan reaksi reduksi selular yang didasarkan pada pemecahan garam tetrazolium MTT berwarna kuning menjadi Kristal formazan berwarna biru keunguan (Basmal *et al*, 2009).

MTT *assay* digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai sitotoksik. semakin besar harga IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik. Hasil analisis probit menunjukkan nilai IC_{50} ekstrak buah mengkudu seperti yang diperlihatkan pada **tabel 1**.

Pada uji aktivitas sitotoksik ekstrak etanolik buah mengkudu terhadap sel kanker serviks hela menghasilkan nilai IC_{50} sebesar 4.094 $\mu\text{g/ml}$. Suatu ekstrak dinyatakan memiliki aktivitas sitotoksik apabila memiliki nilai $IC_{50} \leq 50\mu\text{g/ml}$ (Mans, *et al.*, 2000). Dengan demikian ekstrak tersebut dinyatakan tidak aktif.

Tabel 1. Hasil uji aktivitas sitotoksik ekstrak etanolik buah mengkudu terhadap pertumbuhan sel kanker serviks hela.

konsentrasi	1	2	3	4	rata-rata	%hidup
15,625	0,588	0,5	0,534	0,531	0,53825	151,7489
31,25	0,575	0,544	0,561	0,579	0,56475	161,6802
62,5	0,589	0,566	0,592	0,597	0,586	169,644
125	0,583	0,604	0,551	0,608	0,5865	169,8314
250	0,922	0,804	0,78	0,741	0,81175	254,2473
500	0,874	0,869	0,966	0,87	0,89475	285,3529
1000	0,396	0,405	0,366	0,342	0,37725	91,41162
$IC_{50} : 4094$						



Gambar 1. Profil efek sitotoksik ekstrak etanolik buah mengkudu terhadap sel Hela dengan metode MTT.

Berdasarkan nilai IC_{50} ekstrak tersebut, ekstrak etanolik buah mengkudu pada inkubasi 24 jam dikategorikan mempunyai efek sitotoksik yang rendah (Jenett Siems *et al*, 1999). meskipun demikian, ekstrak etanolik buah mengkudu tetap memiliki efek sitotoksik, namun membutuhkan dosis yang cukup besar. Hal ini ditunjukkan dengan didapatkannya nilai IC_{50} yang cukup besar yaitu 4.094 $\mu\text{g/ml}$.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil yang diperoleh, maka dapat disimpulkan bahwa :

- Ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol 70% dari 750 g serbuk kering buah mengkudu dihasilkan 64 g ekstrak kental.
- nilai IC_{50} ekstrak etanolik buah mengkudu terhadap sel kanker hela adalah 4.094 $\mu\text{g/ml}$.

DAFTAR PUSTAKA

- Bos FX., Ribes J., & Borrás J. 1999. Epidemiology of Primary Liver Cancer. *Sem.Liver Disease*. **19** (3): 271-285.
- BPOM. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Depkes RI.
- Crank, G. 1992. Environmental Carcinogen. *Majalah Farmasiz Indonesia*. **3** (4):8-16.
- Ganiswara, S., Setyabudi, R., Suyatna, FD., dan Purwastyastuti. 1995. dalam Ganiswara, S. (Ed.) *Farmakologi dan Terapi*, Edisi II, Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta.
- Ganiswara, S.G. 1995. '*Farmakologi dan Terapi*'. Bagian farmakologi Fakultas Kedokteran UI: Jakarta.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. 2000. The Hallmarks of Cancer, *Cell*, **100** : 57-70.

- Macdonald, F., Ford C.H.J. 1997. *Molecular Biology of Cancer*. Bio Scientific Publisher, Oxford, United Kingdom.
- Maronpot, R.R. 1991. Chemical Carcinogenesis, in Hascheck, W.M., dan Rousseaux, C.G., (Ed), *Handbook of Toxicologic Pathology*, Academic Press, Inc., San Diego.
- Meiyanto, E. 1999. 'Kurkumin Sebagai Obat Anti Kanker : Menelusuri Mekanisme Aksinya', *Majalah Farmasi Indonesia*, 10 (4): 224-236.
- Meiyanto, E. 2002. *Biologi Molekuler*, Buku Ajar, Proyek QUE Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Meiyanto,E., Sismindari, Kusnandar L.C., Moordiani, 2003, Efek Anti Proliferatif Ekstrak Etanol Daun dan Kulit Batang Tanaman Cangkring (*Erythrina fusca* Lour) terhadap Sel HeLa, MFI, 14, 124-131.
- Melannisa, R., 2004, Pengaruh PGV-1 Pada Sel Kanker Payudara Yang Diinduksi 17-Estradiol:Kajian Antiproliferasi, Pemacuan Apoptosis dan Antiangiogenesis, Tesis, Sekolah Pascasarjana, UGM, Yogyakarta
- Mitchell, W. 1998. *Plant Medicine*, Private Publication, Seattle.
- Mulyadi. 1997. *Kanker, Karsinogen, Karsinogenesis, dan Antikanker*. Cetakan pertama, Penerbit PT. Tiara Wacana Yogya, Yogyakarta.
- Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., and Rodwell V.W.1990.'*Kanker, Oncogen dan Faktor-faktor Pertumbuhan* .'dalam Biokomia Harper, diterjemahkan oleh Hartono A. edisi 2, penerbit EGC, Jakarta.
- Ogata,N., Kamimura,T. and Asakura, H. (1991) *Hepatology*, 13, 31
- Pourmorad, F., S. J. Hosseinimehr andN.Shahabimajd. 2006. 'Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants'. *African Journal of Biotechnology* 5 (11): 1142-1145
- Pitot, H.C., 1993, The Molekuler Biology of Carcinogenesis, *Cancer*, (72): 962-970.
- Rizali, E., dan Auerkari, E.I. 2003. *Teknik pewarnaan Silver (AgNOR) sebagai Salah Satu Cara Menentukan Aktivitas Proliferasi Sel Tumor dan Apoptosis*, JKGI; 10(3): 41-45.
- Schneider, K. A. 1997. *Cancer Genetics, Encyclopedia of Human Biology*, 2nd Edition , Vol.2, Academic Press, London, 312-315.
- Smart, R.C. and Akunda, J.K. 2001. Carcinogenesis, in Hodgson, E., dan Smart, R., C., 2001, *Introductions to biochemical Toxicology*, 3rd Ed., A john Wiley & Sons, Inc., New York.
- Sofyan, R. 2000. Terapi Kanker pada Tingkat Molekuler, *Cermin Dunia Kedokteran*, 127: 5-10.
- Sugiyanto, Sudarto, B., Meiyanto, E., Nugroho, A.E., dan Jenie U.A. 2003. Aktivitas Antikarsinogenik Senyawa yang Berasal dari Tumbuhan, *Majalah Farmasi Indonesia*, 14(4): 216-225.
- Tjindarbumi, D., and Mangunkusumo, R. 2002. Cancer in Indonesia, Present and Future, *Jpn. J. Clin. Oncol.*: 32 (Supplement 1) 517-521.