

PENELUSURAN ISOLAT BIOAKTIF EKSTRAK UMBI SARANG SEMUT TERHADAP KANKER SERVIK (Sel HeLa)

ISOLATE BIOACTIVE ANTS NEST TUBER EXTRACT AGAINST CERVICAL CANCER (HELA CELLS)

Dyah Susilowati, Vivin Nopiyantri
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi

ABSTRAK

Uji sitotoksitas merupakan perkembangan untuk mengidentifikasi obat sitotoksik baru atau deteksi obat dengan aktifitas antitumor dengan menggunakan HeLa cell line yang diturunkan dari sel epitel kanker leher rahim (cerviks) manusia. Sarang semut mengandung flavonoid dan tanin. Flavonoid bagi tubuh berfungsi sebagai antioksidan sehingga ampuh mencegah sekaligus mengatasi serangan kanker. Hasil dari penelitian ini adalah : Fraksi etil asetat umbi sarang semut bersifat sitotoksik Berdasarkan harga LC50 bahwa dari keenam fraksi ekstrak umbi sarang semut *Myrmephytum sebecicum* (Becc.) hanya dua fraksi yang bersifat toksik yaitu fraksi satu (A) dan fraksi dua (B) dengan IC50 = 60.97 µg/ml dan 71.86 µg/ml sedangkan fraksi tiga (C), empat (D), lima (E) dan enam (F) tidak bersifat sitotoksik pada sel HeLa dengan harga LC50 > 100 µg/ml yaitu 29730898 µg/ml, 13980.373µg/ml dan 2667076808 µg/ml. Kemungkinan senyawa aktif yang terdapat pada kandungan fraksi etil asetat ekstrak umbi sarang semut adalah golongan flavonoid yaitu 3',4'-dihidroksi flavon. Kandungan fenolik total dan flavonoid total dari fraksi etil asetat umbi sarang semut adalah sebesar : % b/b EAG untuk senyawa fenolik fraksi 1 = 15.33%, fraksi 2 = 16.36%, fraksi 3 = 12.08%. Sedangkan % b/b EK untuk senyawa flavonoid fraksi 1 = 5.00%, fraksi 2 = 3.92%, fraksi 3 = 3.34%. Kemungkinan senyawa aktif yang terdapat pada kandungan fraksi etil asetat ekstrak umbi sarang semut (*Myrmephytum sebecicum* (Becc.) adalah kemungkinan mengarahkan senyawa pada struktur 5-OH isoflavan O-di OH pada cincin A (6,7 atau 7,8)

Kata kunci : (*Myrmephytum sp.*), sitotoksitas, fraksi etil asetat, sel HeLa

ABSTRACT

Cytotoxicity test is to identify the development of new cytotoxic drugs or drug detection with antitumor activity by using HeLa cell line derived from epithelial cells of cervical cancer (cervical) humans. Anthill contains flavonoids and tannins. Flavonoids act as antioxidants for the body to prevent and overcome powerful attacks tuber extract ant kanker. The results of this study are: ethyl acetate fraction anthill bulbs are cytotoxic Based LC50 that of the sixth fraction ant tuber extract (*Myrmephytumsebecicum* (Becc.) only two fractions that are toxic that a single fraction (A) and two fractions (B) with IC50 = 60.97 mg / ml and 71.86 mg / ml while the three fractions (C), four (D) five (E) and six (F) is not cytotoxic to HeLa cells with LC50 > 100 mg / ml is 29730898µg/ml, 13980.373µg/ml and 2667076808 ug / ml. The possibility of active compound contained in the content of ethyl acetate fraction tuber extract ant is the flavonoid 3', 4'-dihydroxy flavones. Total phenolic content and total flavonoid fraction of ethyl acetate bulbs anthill is: % w / w EAG for phenolic compounds fraction 1 = 15:33%, 2 = 16:36% fraction, fraction 3 = 12:08%. While % w / w EK for flavonoid fraction 1 = 5.00%, 2 = 3.92% fraction, fraction 3 = 3.34%. The possibility of active compound contained in the content of ethyl acetate fraction ant tuber extract (*Myrmephytumsebecicum* (Becc.) is likely to lead compound 5-OH structure isoflavone O-ring DIOH on A (6,7 or 7,8)

Key words: (*Myrmephytum sp.*), Cytotoxicity, ethyl acetate fraction, HeLa cells

PENDAHULUAN

Pesatnya perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi serta berubahnya pola hidup masyarakat berdampak pada munculnya berbagai penyakit degeneratif. Namun saat ini masyarakat mulai sadar dan mengubah pola hidupnya untuk kembali pada alam (*back to nature*), termasuk dalam hal memelihara dan menjaga kesehatan.

Penggunaan obat sintesis telah terbukti banyak menimbulkan efek samping yang tidak diinginkan. Pola makan yang tidak benar mengakibatkan terbentuknya radikal bebas dalam tubuh sehingga muncul beragam penyakit kanker (Hemani dan Rahardjo 2005). Dewasa ini, WHO (*World Health Organisation*) menyatakan bahwa sepertiga dari seluruh kejadian kanker dapat dicegah, sepertiga lagi dapat disembuhkan dan sepertiga sisanya dapat dibebaskan dari rasa nyeri jika diberikan obat. (Dalimartha, 2006)

Kanker adalah suatu penyakit pertumbuhan sel di dalam organ tubuh yang timbul dan berkembang biak sel-sel baru yang tumbuh abnormal, cepat dan tidak terkendali dengan bentuk, sifat dan gerakan yang berbeda dari sel asalnya, serta merusak bentuk dan fungsi organ asalnya.

Kanker leher rahim adalah kanker yang menyerang rahim bagian bawah, pemicunya antara lain : wanita yang menikah diusia muda, wanita yang melakukan senggama dini, wanita dengan social ekonomi rendah, wanita yang sering ganti partner, wanita dengan kebersihan alatewanitaan yang kurang, wanita yang mempunyai banyak anak terutama jarak persalinan yang terlalu dekat, perokok, infeksi virus juga dapat menjadi pemicu terjadinya kanker leher rahim (Rahardjo, 1999). Uji sitotoksitas merupakan perkembangan untuk mengidentifikasi obat sitotoksik baru atau deteksi obat dengan aktifitas antitumor. Uji sebuah obat baru dilakukan melalui serangkaian uji farmakologi dan toksikologi baik yang dilakukan pada hewan uji (pra klinik) maupun uji secara klinik (Doyle and Griffiths, 2000). Penelitian ini menggunakan HeLace. Berdasarkan penelitian dan bukti empiris, ternyata memang ada tumbuhan obat yang berkhasiat untuk pengobatan kanker atau hanya menghilangkan gejala yang ditimbulkannya. Ada tumbuhan obat yang berkhasiat membersihkan racun yang dikeluarkan oleh sel kanker. Gejala sindroma panas yang disebabkan oleh penyakit kanker antara lain rasa haus, kencing berwarna kuning tua, lidah berwarna merah dan denyut nadi yang cepat. Racun yang dikeluarkan oleh sel kanker antara lain dapat menyebabkan timbulnya keputihan atau keluar cairan dari vagina pada kanker serviks (Dalimartha, 2006).

Ahli Peneliti Utama LIPI mengungkapkan bahwa senyawa aktif yang terkandung dalam sarang Semut itu adalah flavonoid, tanin, dan polifenol yang berfungsi sebagai antioksidan dalam tubuh. Flavonoid merupakan golongan senyawa bahan alam dari senyawa fenolik yang banyak merupakan pigmen tumbuhan. Fungsi kebanyakan flavonoid dalam tubuh manusia adalah sebagai antioksidan sehingga sangat baik untuk pencegahan kanker.

BAHAN DAN METODE

Bahan utama yaitu serbuk umbi sarang semut (*Myrmephytumselebicum* (Becc.) Bahan penyaring yang digunakan terdiri dari petroleum eter teknis (Brataco Chemika), kloroform teknis (Brataco Chemika) dan methanol teknis (Brataco Chemika). Bahan untuk uji sitotoksik MTT (*Microculture Tetrazolium Salt*) terdiri dari *cell line* HeLa, RPMI 1640 powder (GIBCO), media penumbuh mengandung *growth factor* 10 % FBS (*Fetal Bovine Serum*) - 0,5 % fungison – 2 % antibiotic penisilin dan streptomisin (GIBCO) dalam medium RPMI 1640, DMSO (Sigma), natrium bikarbonat p.a (Sigma), aquabidest, *hepes powder* (Sigma), MTT (Sigma), larutan SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*) 10 % dalam HCl 0,01 N, alcohol teknis dan korek api.

Uji Sitotoksik. Untuk mengetahui aktivitas antikanker dari fraksi umbi sarang semut maka dilakukan uji sitotoksik. Uji sitotoksik dilakukan dengan metode *direct counting*, dilakukandengan cara langsung menghitung jumlah sel hidup dengan alat hemocytometer dibawah mikroskop. Perhitungan jumlah sel hidup dilakukan dengan bantuan zat warna tripan blue (biru tripan). Metode pewarnaan dengan biru tripan didasarkan pada prinsip bahwa sel yang hidup tidak mengikat zat warna biru tripan hal ini disebabkan karena terjadinya penurunan integritas membrane pada sel yang mati, sehingga biru tripan dapat masuk ke dalam sel dan mewarnai inti sel (Freshney, 1997). Sebaliknya tidak terjadi pada sel yang hidup karena membrane selnya masih utuh sehingga tampak cemerlang karena protein dalam sel tidak berikatan dengan biru tripan. Satu kelompok terdiri dari 5 ekor mencit. Tiap kelompok disensitisasi dengan 2,5 mg OVA dilarutkan dalam 7,75 ml

Al(OH)₃ secara intraperitoneal dengan dosis 0,15 cc/ mencit pada hari ke-0 dan ke-14.

Uji sitotoksik MTT (*Microculture Tetrazolium Salt*).

Sel HeLa disuspensikan dengan kepadatan 3×10^4 sel / sumuran sebanyak 100 μ l kemudian sel dimasukkan pada mikropate 96 sumuran berbeda diinkubasikan dalam inkubator CO₂ 5 % pada suhu 37 oC selama 24 jam, sumuran-sumuran yang berisi suspensi sel tersebut ditambahkan 100 μ l larutan uji yaitu ekstrak etil asetat umbi sarang semut dalam medium tiap sumuran sehingga diperoleh kadar akhir sampel dengan variasi konsentrasi tertentu (100 ; 50 ; 25 ;12,5 ; 6,25) μ g/ml tiap /sumuran, sebagai control digunakan sel tanpa penambahan larutan uji kemudian sel tersebut diinkubasikan pada inkubator CO₂ 5 % pada suhu 37 °C selama 24 jam dan pada akhir inkubasi medium masing-masing sumuran dibuang dan dicuci dengan FBS (*Fetal Bovine Serum*) kemudian ditambahkan 100 μ l media baru. dan 10 μ l MTT 5 mg/ml dalam FBS (*Fetal Bovine Serum*). Mikropate diinkubasikan kembali selama 4 jam pada inkubator CO₂ 5 % pada suhu 37 °C. Sel hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formazan berwarna ungu dan untuk menghentikan reaksi antara sel dengan MTT (*Microculture Tetrazolium Salt*) serta melarutkan formazan maka ditambahkan 100 μ l SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) 10 % dalam 0,01 N HCl , diinkubasikan selama 24 jam pada suhu kamar dan serapan dibaca dengan menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm.

Hitung jumlah sel neutrofil darah tepi. Darah dihomogenkan dengan larutan Turk, kemudian dimasukkan dalam kamar hitung *Improved Neubauer*, dihitung 4 kotak besar dengan perbesaran 10 kali. Kemudian membuat hapusan darah, dengan menampung darah dalam tabung serologis yang telah berisi EDTA. Sampel darah dicat menggunakan larutan *Wright Giemsa*, diamkan selama 1 menit, cuci, kemudian dikeringkan. Selanjutnya dihitung persentase neutrofil terhadap jumlah hitung jenis leukosit dengan perbesaran 1000 kali.

Hitung jumlah granula sel mast di bronkus. Setelah mencit dikorbankan, diambil jaringan bronkus, kemudian direndam dalam larutan formalin buffer 10% selama 10 jam, setelah itu dibuat blok parafin. Selanjutnya dilakukan potongan serial terhadap blok parafin tersebut

untuk dibuat slide masing-masing 2 buah. Setelah itu dilakukan pewarnaan dengan *methylene blue* untuk melihat dan menghitung jumlah granula sel mast, untuk selanjutnya diidentifikasi dengan mikroskop cahaya. Sel mast dengan mikroskop terlihat berbentuk oval atau bulat, ukuran diameter 10-13 μ m, sitoplasma berisi granula basofilik. Inti agak kecil terletak di tengah, seringkali tertutup oleh granula (Junqueira dan Carneiro 2005). Sedangkan granula sel mast yang berbentuk metakromatik padat yang berjumlah 500- 800 per sel dengan berbagai ukuran yang berkisar antara 0,1- 0,4 μ m butiran butiran ini tampak mengelilingi sel mast (Selye Hans 1965). Pada pewarnaan *methylene blue*, granula sel mast akan tampak berwarna ungu-merah tersebar di seluruh sitoplasma, sedangkan inti biasanya tidak terlihat (Martin *et al.* 1991). Kemudian dilakukan penghitungan sel mast secara manual tiap lapang pandang dengan mikroskop cahaya. Setiap preparat masing-masing diamati sebanyak 3 lapang pandang. Diamati dengan mikroskop cahaya perbesaran 100 kali.

Analisa Data. Nilai % kematian yang terjadi karena pemberian senyawa uji untuk setiap variasi konsentrasi adalah jumlah sel mati dihitung dengan menggunakan rumus :

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

LC₅₀ adalah kadar yang menyebabkan kematian 50% populasi sel HeLa. LC₅₀ dihitung dengan persamaan $y = a + bx$, dengan y adalah probit persen kematian sel dan x adalah log kadar.(Ueda *et al.*, 2002).

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Rendemen ekstrak sarang semut.

Berat ekstrak etil asetat yang diperoleh dari maserasi 12 kg umbi sarang semut basah dilanjutkan dengan partisi adalah 120,303 gram. Dari data ini dapat dihitung rendemen ekstrak terhadap berat basah umbi sarang semut sebagai berikut :

$$\begin{aligned} \text{Rendemen ekstrak sarang semut} &= \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat basah umbi}} \times 100\% \\ &= \frac{120,303}{12 \text{ kg}} \times 100\% \\ &= 10,03\% \end{aligned}$$

Dari hasil perhitungan rendemen di atas didapatkan rendemen ekstrak etil asetat sebesar 10,03%,

2. Fraksinasi ekstrak etil asetat

Tahapan fraksinasi pada ekstrak etil asetat dilakukan untuk melacak aktivitas sitotoksitas dari masing – masing fraksi yang diperoleh sampai didapatkan fraksi yang mempunyai aktivitas sitotoksik yang paling kuat 50mg, jahe 25mg, mempunyai efek antiasma yang sama dengan Telfast® sebagai kontrol positif.

Tabel 2. Hasil fraksinasi ekstrak etil asetat

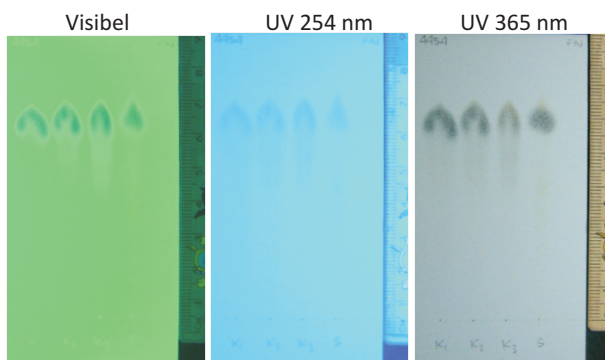
Fraksi ke	Pengamatan secara visual	Efluen Penyusun	Berat (mg)
1 (A)	Merah bata	59, 60, 61	508,8
2 (B)	Coklat kemerahan	62, 63, 64, 65,66	1387
3 (C)	Coklat kemerahan	67, 68	957
4 (D)	Coklat agak tua	69, 70, 71, 72, 73	1369
5 (E)	Coklat tua	74,75,76,77,78,79,80	867
6 (F)	Coklat tua	81, 82, 83, 84, 85, 86	388

3. Penentuan kualitatif fraksi etil asetat

Dari hasil penentuan kualitatif fraksi etil asetat terhadap alkaloid, flavonoid dan fenolik maka didapatkan hasil yang positif yaitu flavonoid dan fenolik. Uji kualitatif yang dilakukan menggunakan KLT dan hasil yang didapatkan diamati secara UV 254 nm, UV 366 nm dan secara visible

3.1 KROMATOGRAM FENOLIK

Sampel : Ekstrak umbi sarang semut



Gambar 1. Hasil uji kualitatif KLT fenolik

P : Perbandingan Fenol E.merck

S : Sampel : K1, K2, K3

Analisa: Kualitatif Senyawa Fenolik

Metode : TLC

Fase Diam : Silika gel 60 F₂₅₄

Fase Gerak: Metanol – Asam Formiat 10% (95-5)

Pereaksi : Ferri Chloride

Warna spot di bawah sinar UV 254 nm : redam

Warna spot senyawa fenolik : hijau kelabu - kelabu

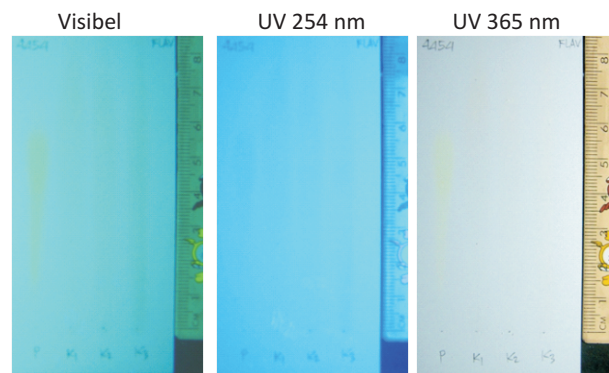
Senyawa fenolik terdeteksi : K1 Rf. 0.75

K2 Rf. 0.75

K3 Rf. 0.75

3.2. KROMATOGRAM FLAVONOID

Sampel : Ekstrak umbi sarang semut



Gambar 2. Hasil uji kualitatif KLT flavonoid

P : Perbandingan Rutin

S : Sampel : K1, K2, K3

Analisa : Kualitatif Flavonoid

Metode : TLC

Fase Diam : Cellulosa

Fase Gerak: Etil Asetat – Asam Formiat –

Asam Asetat – Air (100-11-11-27)

Pereaksi : Amoniak

Warna spot di bawah sinar UV 254 nm : redam

Warna spot flavonoid: kuning

Flavonoid terdeteksi : K1 Rf. 0.88

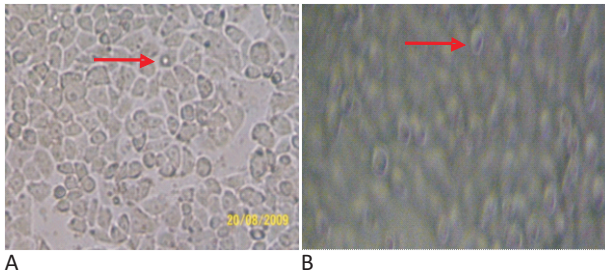
K2 Rf. 0.88

K3 Rf. 0.88

4. Penentuan aktivitas sitotoksik ekstrak etil asetat serta masing – masing fraksinya

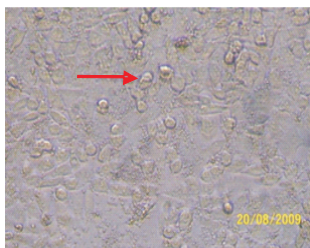
Uji sitotoksik ini digunakan pelarut DMSO disertai control uji menggunakan DMSO. Pengaruh penggunaan berbagai konsentrasi pelarut DMSO

pada kematian sel HeLa menunjukkan bahwa kontrol pelarut dengan konsentrasi tertinggi 0,1 % ada pengaruh sedikit pada kematian sel HeLa. Hal ini dapat dilihat pada morfologi sel HeLa pada control pelarut dan control negative.



Gambar 3. Foto mikroskopik morfologi sel HeLa tanpa perlakuan pelarut/ control sel (A) dan (B) dengan control pelarut medium penumbuh dengan konsentrasi 0,1 % Sel hidup

Pada penelitian ini ekstrak etil asetat mempunyai aktivitas toksik pada sel HeLa yang dapat ditunjukkan dengan penampakan sel dengan perlakuan ekstrak etil asetat pada Fraksi A dan B sedangkan pada Fraksi C, D, E dan F pada konsentrasi 200 ; 100 ; 50 ; 25 dan 12,5 µg/ml sel HeLa masih banyak yang hidup dapat dilihat berdasarkan morfologi sel HeLa pada Gambar 4. (A-F) = A

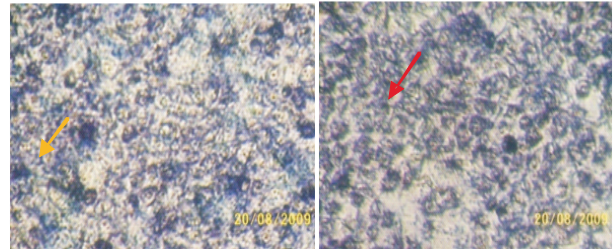


Gambar 4. Pengaruh ekstrak etil asetat pada Fraksi (A – F) perwakilan = A pada konsentrasi 200 ; 100 ; 50 ; 25 dan 12,5 µg/ml terhadap morfologi sel HeLa

Keterangan :

Jumlah morfologi sel HeLa yang paling banyak adalah pada kelompok Media control (x). Sel HeLa setelah diberi ekstrak 200 ; 100 ; 50 ; 25 dan 12,5 µg/ml pada Fraksi A dan B mengalami kematian tetapi pada Fraksi C, D, E dan F sel HeLa masih banyak yang hidup :
 → = Sel HeLa Mati ;
 → = Sel HeLa Hidup

Sel mati tidak akan mereduksi MTT (*Microculture Tetrazolium Salt*) yang ditunjukkan pada Gambar 5. Setelah Penambahan MTT



Gambar 5. Pengaruh ekstrak etil asetat setelah penambahan MTT pada Media control (X) dan Fraksi (A – F) perwakilan = A dengan konsentrasi 200 ; 100 ; 50 ; 25 dan 12,5 µg/ml terhadap morfologi sel HeLa

Keterangan :

Setelah pemberian MTT Jumlah sel HeLa yang paling banyak adalah pada kelompok Media control (x). Sel HeLa setelah diberi ekstrak 200 ; 100 ; 50 ; 25 dan 12,5 µg/ml pada Fraksi A dan B mengalami kematian tetapi pada Fraksi C, D, E dan F sel HeLa masih banyak yang hidup :
 → = Sel HeLa Mati ;
 → = Sel HeLa Hidup

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dan pembahasan maka dapat diambil kesimpulan yaitu :

Dua fraksi yang bersifat sitotoksik kuat yaitu fraksi satu (A) dan fraksi dua (B) dengan LC50 = 60.97 µg/ml dan 71.86 µg/ml sedangkan fraksi tiga (C), empat (D), lima (E), dan enam (F) tidak bersifat sitotoksik pada sel HeLa dengan harga LC50 > 100 µg/ml yaitu 29730898µg/ml, 13980.373µg/ml dan 2667076808 µg/ml

DAFTAR PUSTAKA

- Ahkam Subroto, M., dan Hendro Saputro, Gempur Penyakit Dengan Sarang Semut, Jakarta, 2006
- Akowuah, G.A.,Zhari I., Norhayati I., Sadikun A., and Khamsah, S.M., 2004, Sinensetin, eupatorin, 3'-hydroxy-5,6,7,4'-tetra methoxy flavone and Rosmarinic Acid Contents and Antioxidative Effect of Orthosiphon stamineus from Malaysia, J Food Chem, 87, 559-566
- Anonim, Dyeing Reagents for Thin Layer and Paper Chromatography, E.Merck, Darmstadt, Germany, 1978,p. 52, no. 166.
- Anonim, 1985, Cara Pembuatan Simplisia, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, 1, 9-19, 108-110.

- Anonim, 1986, Sediaan Galenik, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, 10-16
- Ansel, H.C., 1989. Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi. Edisi IV. Jakarta : Universitas Indonesia. 605 - 608.
- Caillet, S., Salmieri, S., and Lacroix, M., 2006, Evaluation of Free Radical Scavenging properties of Commercial grape Phenol Extracts by a Fast colometric method, J Food Chem, 95, 1-
- Dalimarta, S., 2004, Deteksi Dini Kanker dan Simplisia Antikanker, Penebar Swadaya, Jakarta, 3-4.
- Doyle, A., and Griffith, S.B., 2000. Cell and Tissue Culture for medical Research, John Willey and Sons Ltd, New York, 403-423.
- Endang, SR.,2009, Pelacakan Antioksidan dan Penentuan Flavonoid Total Umbi Sarang Semut (*Myrmephytum sebecicum*. Becc)