

Efek Sitotoksik Ekstrak Etanol Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*) pada Sel Line Kanker Serviks HeLa Uji Eksperimental Secara In Vitro

Cytotoxic Effect of Ethanolic Extract of Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*) on HeLa Cervix Cancer Cell Line

In Vitro Experimental Study

Dina Fatmawati^{1*}, Prista Karina Puspitasari², Iwang Yusuf¹

ABSTRACT

Background: Sarang semut (*Myrmecodia pendens*) is a traditional plant that has been known to contain anti cancer components. Flavonoids and tannins were contained in sarang semut plant which are believed has cytotoxic effect against cancer cell line. This study aims at cytotoxic effect ethanolic extract of sarang semut at various concentrations on HeLa cervical cancer cell line.

Design and Method: The method was quasi experimental with post test only non equivalent control group design. HeLa cell was divided into two groups. The first group as positive control with doxorubicin, second group as treatment with ethanolic extract of sarang semut at various concentrations. Ethanolic extract of sarang semut concentrations used were 3,91 µg/ml; 7,81 µg/ml; 15,63 µg/ml; 31,25 µg/ml; 62,50 µg/ml; 125 µg/ml; 250 µg/ml; 500 µg/ml; 1000 µg/ml. Cytotoxic effect was evaluated by direct counting method with trypan blue dye then using probit regression analysis to find IC_{50} value.

Result: Inhibitory concentration 50 (IC_{50}) value ethanolic extract of sarang semut was 33,28 µg/ml. Ethanolic extract of sarang semut had a cytotoxicity effect categorized as the moderately active ($20 \mu\text{g/ml} < IC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$). Inhibitory concentration 50 (IC_{50}) value doxorubicin was 5,56 µg/ml. Cytotoxicity effect of doxorubicin higher than cytotoxicity effect of ethanolic extract of sarang semut.

Conclusion: Ethanolic extract of sarang semut (*Myrmecodia pendens*) had a cytotoxic effect categorized as the moderately active on HeLa cell (Sains Medika, 3(2):112-120).

Key words: HeLa cervix cancer cell line, cytotoxic effect, ethanolic extract of sarang semut (*Myrmecodia pendens*).

ABSTRAK

Pendahuluan: Sarang semut merupakan tanaman tradisional yang diketahui mengandung komponen anti kanker. Flavonoid dan tanin yang terkandung dalam tumbuhan sarang semut dipercaya memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari efek sitotoksik ekstrak etanol sarang semut (*Myrmecodia pendens*) dengan berbagai konsentrasi terhadap sel HeLa (sel kanker serviks yang dikulturkan) secara *in vitro*.

Metode Penelitian: Penelitian kuasi eksperimental dengan *post test only non equivalent control group design* ini menggunakan sel HeLa yang dibagi menjadi dua kelompok, yaitu kontrol positif dengan doxorubisin dan kelompok perlakuan dengan ekstrak etanol sarang semut dalam berbagai konsentrasi. Konsentrasi ekstrak etanol sarang semut yang dipakai yaitu 3,91 µg/ml; 7,81 µg/ml; 15,63 µg/ml; 31,25 µg/ml; 62,50 µg/ml; 125 µg/ml; 250 µg/ml; 500 µg/ml; 1000 µg/ml. Efek sitotoksik dinilai dengan metode *direct counting* dengan pewarnaan *trypan blue* kemudian dilakukan analisis regresi probit untuk mencari nilai IC_{50} .

Hasil Penelitian: Nilai IC_{50} ekstrak etanol sarang semut sebesar 33,2819 µg/ml. Ekstrak etanol sarang semut memiliki efek sitotoksik kategori cukup aktif ($20 \mu\text{g/ml} < IC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$). Nilai IC_{50} doxorubisin sebesar 5,5595 µg/ml. Efek sitotoksik doxorubisin lebih besar daripada efek sitotoksik ekstrak etanol sarang semut.

Kesimpulan: Ekstrak etanol sarang semut (*Myrmecodia pendens*) memiliki efek sitotoksik kategori cukup aktif terhadap sel HeLa (Sains Medika, 3(2):112-120).

Kata kunci : sel kanker serviks HeLa, efek sitotoksik, ekstrak etanol sarang semut (*Myrmecodia pendens*).

1 Bagian Biologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung (UNISSULA)

2 Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung (UNISSULA)

* E-mail : diena_home@yahoo.co.id

PENDAHULUAN

Kanker serviks merupakan penyebab kematian ketiga akibat kanker pada wanita dengan 529.000 kasus baru di dunia pada tahun 2008 (IARC, 2010). Di Indonesia diperkirakan terdapat 100 penderita kanker baru untuk setiap 100.000 penduduk per tahun. Prevalensi kanker serviks di Provinsi Jawa Tengah dari tahun ke tahun semakin meningkat, dari 0,02% pada tahun 2006, menjadi 0,03% pada tahun 2007, dan pada tahun 2008 masih tetap 0,03%. Pada tahun 2007, prevalensi tertinggi adalah di Kota Semarang sebesar 0,22% (Depkes, 2009).

Berbagai strategi terapi pengobatan kanker serviks telah dilakukan diantaranya dengan menggunakan terapi bedah, radioterapi, dan kemoterapi maupun kombinasi ketiganya, (Nakano *et al.*, 2010) menyebutkan bahwa radioterapi merupakan salah satu cara efektif untuk mengobati penderita kanker serviks, namun hanya terbatas pada ukuran tumor yang kecil karena terkait dengan penggunaan dosis radioterapi. Penggunaan dosis radioterapi yang lebih besar dapat mengakibatkan kerusakan pada jaringan normal. Beberapa terapi pengobatan kanker hanya efektif untuk beberapa periode waktu saja dan bersifat merusak seluruh sel termasuk sel yang normal sekalipun. Beberapa strategi untuk memperlama usia harapan hidup dan mengurangi gejala telah dilakukan tetapi, masih diperlukan terapi baru yang dapat menghilangkan tumor primer dan sekunder dengan pentargetan yang lebih efisien.

Indonesia merupakan negara megabiodiversitas memiliki keanekaragaman hayati terutama pada jenis berbagai tumbuhan yang diantaranya mempunyai potensi sebagai tanaman obat namun belum banyak dikembangkan. Sarang semut (*Myrmecodia pendens*) merupakan salah satu tumbuhan khas Indonesia yang dapat dikembangkan sebagai kandidat antikanker. Penelitian yang telah dilakukan oleh Soeksmanto *et al.*, (2010) menyebutkan ekstrak polar sarang semut dengan menggunakan pelarut air menunjukkan efek antikanker lebih tinggi terhadap sel kanker serviks dibandingkan dengan ekstrak nonpolar sarang semut dengan menggunakan etil asetat dan n-butanol. Tumbuhan sarang semut mengandung senyawa metabolit sekunder berupa flavonoid dan tanin (Subroto dan Saputro, 2006). Flavonoid berperan dalam inaktivasi karsinogen, antiproliferasi, penghambatan siklus sel, induksi apoptosis dan diferensiasi, inhibisi

angiogenesis, dan pembalikan resistensi multi-obat atau kombinasi dari mekanisme-mekanisme tersebut (Ren *et al.*, 2003). Tanin berfungsi untuk menghambat pertumbuhan sel kanker (Yi *et al.*, 2005).

Pada penelitian ini digunakan sel HeLa sebagai model sel kanker serviks. Sel HeLa merupakan *continous cell line* yang terinfeksi oleh *Human Papiloma Virus* (HPV) yang memiliki gen p53 dan p105Rb dalam bentuk *wild type*. Protein E6 dan E7 yang berasal dari HPV memodulasi sejumlah protein seluler yang berperan dalam apoptosis dan proliferasi sel. Aktivitas proliferasi yang berlebihan pada sel HeLa diakibatkan oleh ikatan antara protein E6 yang berikatan dengan gen p53 sehingga mempercepat degradasi p53 dan stimulasi aktivitas enzim telomerase. Protein E7 berperan dalam meningkatkan aktivitas proliferasi sel melalui hiperfosforilasi p105Rb (DeFilipis *et al.*, 2003).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya efek sitotoksik ekstrak etanol sarang semut (*Myrmecodia pendens*) terhadap sel HeLa (Sel kanker serviks) secara *in vitro*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat mengembangkan pemanfaatan sarang semut (*Myrmecodia pendens*) sebagai kandidat antikanker khususnya kanker serviks.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung (FK Unissula) Semarang. Penelitian kuasi eksperimental ini menggunakan rancangan *post test only with non equivalent control group design*. Subyek yang digunakan pada penelitian ini adalah sel kanker serviks HeLa.

Ekstraksi Etanol

Sarang semut diperoleh dari daerah Papua dalam bentuk utuh dan kering. Proses ekstraksi dilakukan di Laboratorium Kimia FK Unissula. Sebanyak 300 gram sarang semut di ekstraksi menggunakan metode *soxhletasi* dengan pelarut etanol selama 16 kali *floading*. Hasil ekstraksi berupa cairan diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak pekat sarang semut. Ekstrak pekat sarang semut dikeringkan dengan menggunakan oven suhu 40°C selama 5 menit kemudian digerus sehingga diperoleh ekstrak sarang semut dalam bentuk serbuk sebanyak 2,04 gram.

Pembuatan Larutan Stok Ekstrak Etanol Sarang Semut

Ekstrak etanol sarang semut ditimbang sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan dalam DMSO sebanyak 10 mL sehingga diperoleh larutan stok ekstrak etanol sarang semut dengan konsentrasi 1 mg/mL. Konsentrasi tertinggi ekstrak etanol sarang semut yang digunakan sebesar 1 mg/mL diperoleh dengan pengenceran larutan stok ekstrak etanol sarang semut dengan media kultur kemudian dibuat 9 seri konsentrasi dengan mengencerkan 1:1 sampai diperoleh konsentrasi terendah sebesar 3,91 µg/mL.

Uji Sitotoksitas ekstrak etanol sarang semut pada sel HeLa

Uji sitotoksik dilakukan di Laboratorium Biologi FK Unissula. Sel HeLa yang telah dikultur kemudian dipanen. Setelah dipanen, sel HeLa dimasukkan dalam sumuran pada *plate cluster 96*. Kepadatan sel HeLa dihitung dengan *haemocytometer* tiap sumuran yaitu 5×10^4 /ml.

Uji sitotoksitas dengan metode perhitungan langsung dilakukan dengan membagi menjadi dua kelompok, kelompok I adalah kontrol positif yaitu sel HeLa yang diberikan doksorubisin konsentrasi 0,78 µg/ml; 1,56 µg/ml; 3,13 µg/ml; 6,25 µg/ml; 12,50 µg/ml; 25 µg/ml; 50 µg/ml; 100 µg/ml. Dalam penelitian ini, doksorubisin berfungsi sebagai "*standard agent*" yang bertujuan untuk mempelajari dan menganalisis produk atau kandidat antikanker yang sedang diuji. *Standard agent* yaitu dasar pengujian dan standarisasi produk, penilaian kemampuan produk dan pengembangan untuk memonitor kualitas kontrol produk (Teicher and Andrews, 2004).

Kelompok II adalah sel HeLa yang diberikan ekstrak etanol sarang semut dengan konsentrasi 3,91 µg/ml; 7,81 µg/ml; 15,63 µg/ml; 31,25 µg/ml; 62,50 µg/ml; 125 µg/ml; 250 µg/ml; 500 µg/ml; 1000 µg/ml. Masing-masing konsentrasi yang telah disebutkan di atas dimasukkan ke dalam *tissue culture cluster 96* sebanyak 100 µl dan ditambahkan suspensi sel sebanyak 100 µl. Seri konsentrasi diulang tiga kali. Kultur kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam aliran CO₂ 5%. Pengamatan efek sitotoksik ditentukan berdasarkan prosentase jumlah sel yang hidup dengan menggunakan metode *direct counting* pewarnaan *trypan blue*. Penentuan prosentase sel yang hidup dihitung dengan menggunakan rumus :

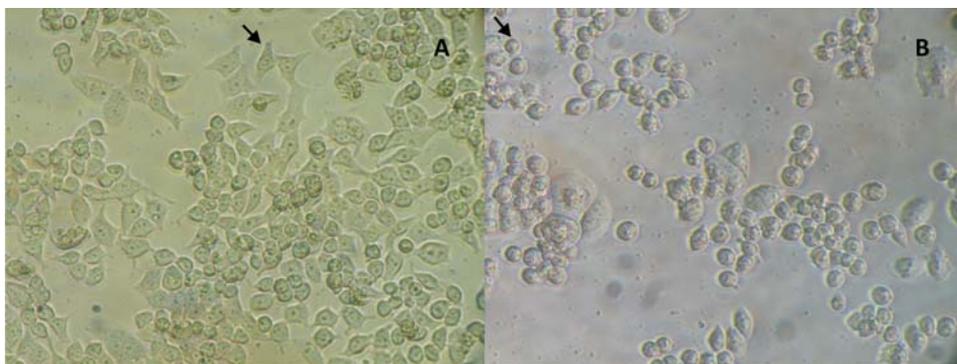
$$\frac{\text{Sel yang hidup pada pemberian ekstrak}}{\text{Sel yang hidup pada kontrol}} \times 100\%$$

Analisis Hasil

Data yang diperoleh dalam penelitian ini selanjutnya diuji menggunakan analisis probit untuk menentukan IC_{50} dan disajikan dalam kurva log dosis-respon (Djajanegara dan Wahyudi, 2010).

HASIL PENELITIAN

Aktivitas sitotoksik ekstrak etanol sarang semut terhadap sel HeLa dapat diamati dari perubahan morfologi sel setelah 24 jam perlakuan. Sel mengalami perubahan bentuk menjadi lebih bulat dengan kepadatan lebih rendah dibandingkan dengan kontrol sel (Gambar 1).

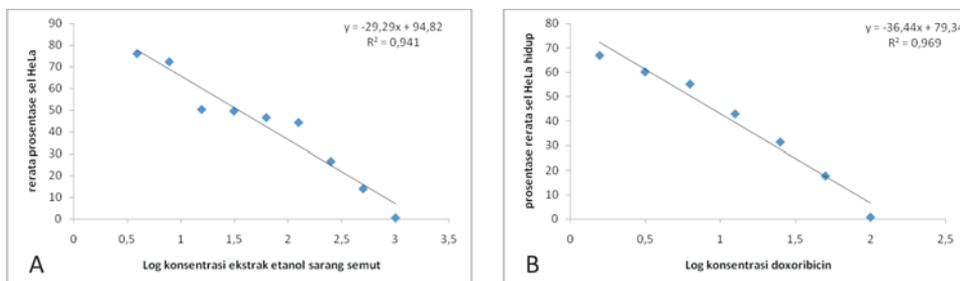


Gambar 1. Morfologi sel HeLa diamati dibawah mikroskop perbesaran 100x. gambar diambil dengan kamera canon lexus 100. (A) Morfologi sel HeLa pada kelompok kontrol setelah 24 jam (B) Morfologi sel HeLa pada kelompok perlakuan 15,63 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Berdasarkan Gambar 1 tampak sel HeLa pada kelompok kontrol berbentuk poligonal dengan intisel yang tampak jelas. Kelompok ekstrak etanol sarang semut dosis 15,63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mempengaruhi perubahan morfologi sel menjadi lebih bulat berukuran kecil dengan kepadatan sel yang lebih rendah dibandingkan dengan kontrol.

Pada penelitian ini masing-masing subyek dilakukan replikasi 3 kali dan kemudian dilakukan penghitungan jumlah sel HeLa hidup tiap kelompok. Efek sitotoksik terhadap sel HeLa dilihat dari prosentase sel HeLa yang hidup. Penetapan jumlah sel yang bertahan hidup pada uji sitotoksitas ini dilakukan berdasarkan parameter perubahan permeabilitas membran sel HeLa dengan pewarnaan *trypan blue*. Sel yang hidup terlihat berbentuk bulat utuh dan berwarna jernih sedangkan sel yang mati berwarna biru akibat

masuknya pewarna *trypan blue* ke dalam sel. *Trypan blue* merupakan zat warna yang bersifat impermeabel terhadap membran sel, adanya peningkatan permeabilitas membran sel mengakibatkan *trypan blue* dapat masuk ke dalam sel (Djajanegara dan Wahyudi, 2010).



Gambar 2. Grafik rerata prosentase sel HeLa yang hidup (A) Terhadap Log konsentrasi ekstrak etanol sarang semut (B) Terhadap Log konsentrasi doksorubisin

Pada Gambar 2 menunjukkan ekstrak sarang semut maupun doksorubisin dengan berbagai konsentrasi menyebabkan penurunan jumlah sel HeLa yang hidup. Prosentase sel HeLa yang hidup paling rendah sebesar 0,6% terdapat pada konsentrasi 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sedangkan, prosentase sel HeLa yang hidup tertinggi sebesar 76% terdapat pada konsentrasi 3,91 $\mu\text{g}/\text{mL}$ setelah pemberian ekstrak sarang semut. Hasil analisis probit ekstrak etanol sarang semut menunjukkan nilai IC_{50} sebesar 33,28 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Adanya korelasi antara konsentrasi larutan uji dengan efek sitotoksik pada sel HeLa ditunjukkan dengan nilai korelasi sebesar 0,941 yang berarti 94,1% respon sel HeLa berhubungan dengan pemberian ekstrak sarang semut.

Pada penelitian ini digunakan doksorubisin sebagai agen standar pada pengobatan kanker payudara. Tujuan digunakan agen standar adalah untuk menganalisis dan mempelajari produk atau kandidat senyawa antikanker yang sedang diuji. Prosentase sel HeLa yang hidup paling rendah sebesar 0,85% terdapat pada konsentrasi 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sedangkan prosentase sel HeLa yang hidup tertinggi sebesar 67% terdapat pada konsentrasi 1,56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ setelah pemberian doksorubisin. Hasil analisis probit doksorubisin menunjukkan nilai IC_{50} sebesar 5,56 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Nilai korelasi sebesar 0,969 memberikan gambaran bahwa 96,9% respon sel HeLa berhubungan dengan pemberian doksorubisin.

PEMBAHASAN

Secara umum efek sitotoksik menunjukkan adanya fenomena *dose dependent response*, dimana efek sitotoksik meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak yang diberikan. Nilai IC_{50} ekstrak etanol sarang semut adalah 33,28 $\mu\text{g/ml}$, menunjukkan tumbuhan sarang semut mempunyai sifat sitotoksik dengan kategori cukup aktif ($20 \mu\text{g/ml} < IC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$) (Tanamatayarat *et al.*, 2003). Flavonoid dan tanin yang terkandung dalam tumbuhan sarang semut mengakibatkan efek toksik pada sel HeLa. Flavonoid akan meningkatkan p53 yang akan meningkatkan apoptosis (Ren *et al.*, 2003) dan tanin akan meningkatkan p27 yang menyebabkan penghentian siklus sel (Nam *et al.*, 2001) kemudian terjadi perubahan permeabilitas membran sel HeLa. Hal tersebut ditunjukkan dengan perubahan morfologi sel setelah pemberian ekstrak sarang semut pada kultur sel HeLa dan masuknya pewarna *trypan blue* yang bersifat impermeabel terhadap membran sel utuh.

Terdapat hubungan antara kenaikan konsentrasi ekstrak etanol sarang semut dengan penurunan prosentase sel HeLa yang hidup. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol sarang semut memiliki efek toksik terhadap pertumbuhan sel HeLa. Efek sitotoksik ekstrak etanol sarang semut akan menyebabkan sel HeLa mati yang ditandai dengan perubahan permeabilitas membran sel HeLa. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol sarang semut, perubahan permeabilitas membran sel HeLa yang terjadi semakin besar. Efek sitotoksik ekstrak etanol sarang semut terbesar terdapat pada konsentrasi 1000 $\mu\text{g/ml}$ dengan prosentase sel HeLa yang hidup sebesar 6%, sedangkan efek sitotoksik terendah terdapat pada konsentrasi 3,91 $\mu\text{g/ml}$ dengan prosentase sel HeLa yang hidup sebesar 76%.

Hasil penelitian ini sesuai dengan Soeksmanto *et al.*, (2010) yang menyatakan bahwa flavonoid dan tanin dapat menghambat pertumbuhan sel kanker penelitian tersebut menggunakan ekstrak n-butanol sarang semut dengan $IC_{50} = 42,33$ ppm pada sel HeLa dan $IC_{50} = 87,13$ ppm pada sel MCM-B2 sedangkan ekstrak etilasetat sarang semut dengan $IC_{50} = 48,13$ ppm pada sel HeLa dan $IC_{50} = 111,06$ ppm pada sel MCM-B2 yang diujikan dengan *Haemocytometer Tiefe Neubauer*. Hasil dari penelitiannya, ekstrak sarang semut dalam dosis tertentu cukup aktif untuk pengobatan kanker serviks dan kanker payudara.

Dalam penelitian ini, terdapat beberapa keterbatasan antara lain : pada penelitian yang dilakukan hanya mengamati efek sitotoksik pada sel HeLa sebagai model kanker serviks, tetapi selektivitas sitotoksik terhadap sel normal belum dilakukan sehingga tingkat keamanan ekstrak etanol sarang semut terhadap sel normal belum diketahui. Efek sitotoksik ekstrak etanol sarang semut terhadap sel HeLa diduga dapat melalui jalur siklus sel maupun apoptosis. Namun, pada penelitian ini belum dikaji mengenai mekanisme kerja ekstrak etanol sarang semut terhadap sel HeLa.

KESIMPULAN

Ekstrak etanol sarang semut (*Myrmecodia pendens*) memiliki efek sitotoksik pada sel line kanker serviks HeLa dengan nilai IC_{50} sebesar 33,28 $\mu\text{g/ml}$.

SARAN

Perlu dilakukan uji selektivitas terhadap sel normal untuk mengetahui keamanan dari ekstrak etanol sarang semut dan dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai mekanisme kerja ekstrak etanol sarang semut yang menyebabkan sitotoksitas dari sel HeLa.

DAFTAR PUSTAKA

- Depkes, 2009, Profil Kesehatan Provinsi Jawa Tengah Tahun 2009, <http://www.depkes.go.id>, Dikutip tgl. 15.11.2010.
- DeFilipis R.A., Goodwin E.C., Wu L., DiMaio D., 2003. Endogenous Human Papilloma Virus E6 and E7 Proteins Differentially Regulate Proliferation Senescens and Apoptosis in HeLa Cervical Carcinoma Cell, *Journal of Virology*, 77 (2); 1551-63.
- Djajanegara, I. dan Wahyudi, P., 2010, Uji Sitotoksitas Ekstrak Etanol Herba Ceplukan (*Physalis angulata* Linn.) terhadap Sel T47D secara In Vitro, *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia* 8 (1): 41-47.
- IARC, 2010, Cervical Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008, Dalam <http://www.globocan.iarc.fr>, Dikutip tgl. 1.10.2010.
- Nakano T, Ohno T, Ishikawa H, Suzuki Y, Takashi T. Current advancement in radiation therapy for utarine cervical cancer. *J Radial Res* 2010;51(1):1-8
- Nam, S., Smith, D.M., Dou, Q.P., 2001, Tannic Acid Potently Inhibits Tumor Cell Proteosome Activity Increase p27 and Bax Expression, and Induces G1 Arrest and Apoptosis, *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 10: 1083-1088.

- Ren W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu L., Zhang, L., 2003, Flavonoids: Promising Anticancer Agents, *Medicinal research Reviews*, 23(4): 519- 534.
- Soeksmanto, A., Subroto, M.A., Wijaya, H., Simanjuntak, P., 2010, Anticancer Activity test for Extract of Sarang Semut Plant(*Myrmecodya Pendens*) to HeLa and MCM-B2 Cells, *Pakistan Journal of Biological Science* 13(3): 148-151.
- Subroto, M.A. dan Saputro H., 2006, *Gempur Penyakit dengan Sarang Semut*, Penebar Swadaya, Depok, halaman 15-31.
- Tanamatayarat, P., Limtrakul, P., Chunsakaow, S., Duangrat, C., 2003, Screening of Some Rubiaceous Plants for Cytotoxic Activity Against Cervix Carcinoma (KB-3-1) Cell Line, *Thai J. Pharm. Sci.* 27 (3-4): 167-172.
- Teicher B.A. and Andrews P.A., 2004, *Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval Second Edition*, Humana Press, Totowa.
- Yi, W., Fischer, G., Krewer G., Akoh C.C., 2005, Phenolic Compounds From Blueberries Can Inhibit Colon Cancer Cell Proliferation And Induce Apoptosis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (18): 7320-7329.