

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN SITOTOKSIK EKSTRAK METANOL KULIT BATANG KAMBOJA (*Plumeria acuminata*) TERHADAP SEL KANKER LEHER RAHIM

*Antioxidant and Cytotoxic Activity of Methanolic Extract of Kamboja Stem Bark (*Plumeria acuminata*) on Cervical Cancer Cell Line*

Khoirun Nisyak* dan M. Farid Rahman**

*Program Studi DIII Analisis Kesehatan, STIKES Rumah Sakit Anwar Medika, Sidoarjo

**Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang

*e-mail : nisachemist@gmail.com

ABSTRACT

*Cervical cancer is one of the biggest cancer-causing cancers in women in developing countries caused by Human Papilloma Virus (HPV). Various studies of cervical cancer treatment have been done, one of them drug-based development of plant extracts. The stem bark of kamboja (*Plumeria acuminata*) is reported to have antioxidant and cytotoxic activity. This study aims to determine the antioxidant and cytotoxic activity of kamboja stem bark methanolic extract to cervical cancer cells (HeLa cells). Antioxidant activity was measured by spectrophotometric method using DPPH. Cytotoxic activity of HeLa cells was done by MTT assay method. The results showed that the methanolic extract of kamboja stem bark had antioxidant activity, with IC_{50} value of 136.43 ppm. The methanolic extract of kamboja stem bark showed cytotoxic activity on HeLa cells with the IC_{50} 8.38 ppm. Based on the results of the study showed that the methanolic extract of kamboja stem bark have potency as an anticancer material.*

Keywords : *cervical cancer, kamboja stem bark, antioxidant, cytotoxic, and HeLa cell.*

ABSTRAK

Kanker leher rahim merupakan salah satu kanker penyebab kematian terbesar pada wanita di negara berkembang yang disebabkan oleh *Human Papilloma Virus* (HPV). Berbagai penelitian penanganan kanker leher rahim telah dilakukan, salah satunya pengembangan obat berbasis ekstrak tanaman. Kulit batang kamboja (*Plumeria acuminata*) dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan dan sitotoksik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dan sitotoksik ekstrak metanol kulit batang kamboja terhadap sel kanker leher rahim (sel HeLa). Aktivitas antioksidan diukur dengan metode spektrofotometri menggunakan DPPH. Aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa dilakukan dengan metode *MTT assay*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanol kulit batang kamboja bersifat antioksidan, dengan memiliki nilai IC_{50} sebesar 136,43 ppm. Aktivitas sitotoksik ekstrak metanol kulit batang kamboja terhadap sel HeLa menghasilkan nilai IC_{50} sebesar 8,38 ppm. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, ekstrak metanol kulit batang kamboja berpotensi sebagai bahan antikanker.

Kata Kunci : kanker leher rahim, kulit batang kamboja, antioksidan, sitotoksik, dan sel HeLa

PENDAHULUAN

Kanker leher rahim adalah kanker pada leher rahim atau serviks, yaitu area bawah pada rahim yang menghubungkan rahim dengan vagina. Kanker leher rahim disebabkan oleh *Human Papilloma Virus* (HPV) tipe 16 (Kessler, 2017). Kanker leher rahim merupakan penyebab kematian terbesar pada wanita di Indonesia, menduduki urutan kedua dari 10 kanker terbanyak berdasarkan data Patologi Anatomi tahun 2010 dengan insiden sebesar 12,7% (Sulistiowati, Lolong, & Pangaribuan, 2016). Jumlah wanita baru penderita kanker leher rahim berkisar 90 – 100 kasus per 100.000 penduduk dan setiap tahun terjadi 40.000 ribu kasus (Rasjidi, 2009).

HPV merupakan virus DNA yang dapat menimbulkan proliferasi pada permukaan epidermis dan mukosa leher rahim (Sawaya, 2017). Faktor resiko terjadinya kanker leher rahim meliputi aktivitas seksual pada usia muda, berhubungan seksual dengan multipartner, merokok, penyakit menular seksual, dan gangguan imunitas (Taupiqurrohman *et al.*, 2016). Selama ini pengobatan kanker leher rahim dilakukan dengan cara pembedahan, kemoterapi, radioterapi, dan pengobatan alternatif lainnya. Bahan antikanker yang ideal akan membasmi sel kanker tanpa merusak jaringan normal dan dapat dijangkau oleh masyarakat.

Beberapa masalah yang terjadi dalam pengobatan kanker saat ini adalah efek samping, resistensi, biaya pengobatan cukup tinggi, serta timbulnya komplikasi. Berdasarkan permasalahan tersebut maka perlu dilakukan pengembangan pengobatan alternatif kanker leher rahim dengan memanfaatkan ekstrak dari tanaman Indonesia, salah satunya adalah kamboja.

Kamboja (*Plumeria acuminata*) merupakan salah satu tanaman hias marga *Plumeria* yang tumbuh subur di Indonesia (Gambar 1). Pohon kamboja ditanam

sebagai tanaman hias di pekarangan rumah, taman, dan areal pemakaman. Kamboja memiliki daun, bunga, akar, dan kulit batang yang mengandung senyawa aktif yang berpotensi dikembangkan sebagai bahan obat. Daun kamboja digunakan dalam pengobatan tradisional sebagai pencahar dan antigatal, kulit batang dilaporkan memiliki aktivitas antiinflamasi (Gupta *et al.*, 2006). Penelitian mengenai bioaktivitas kulit batang kamboja sebagai bahan antikanker belum pernah dilaporkan.

Penelitian aktivitas antioksidan dan sitotoksik ekstrak kulit batang kamboja perlu dilakukan untuk mengetahui potensinya sebagai bahan antikanker yang dapat dikembangkan lebih lanjut. Ekstraksi kandungan senyawa aktif dari kulit batang kamboja dilakukan dengan metode maserasi bertingkat menggunakan pelarut petroleum eter dan metanol. Ekstrak metanol kulit batang kamboja selanjutnya diuji aktivitas antioksidan dan sitotoksiknya. Aktivitas antioksidan diukur dengan metode spektrofotometri menggunakan 1,1-difenil-2-pikril hidrazil (DPPH). Aktivitas antikanker leher rahim dilakukan dengan uji sitotoksik secara *in vitro* menggunakan sel HeLa (sel epitel kanker leher rahim manusia). Uji sitotoksik terhadap sel HeLa menggunakan metode MTT *assay*. Metode MTT *assay* dapat mengukur proliferasi sel secara kolorimetri. Menurut Chueahongthong *et al* (2011), metode MTT *assay* relatif cepat, sensitif, akurat, dapat mengukur sampel dalam jumlah besar, dan hasilnya dapat memprediksi sifat sitotoksik suatu bahan. Metode MTT *assay* berdasarkan pada perubahan garam tetrazolium [3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida] menjadi formazan dalam mitokondria yang aktif pada sel hidup.

METODE PENELITIAN

Penelitian aktivitas antioksidan dan sitotoksik ekstrak metanol kulit batang kamboja di Laboratorium Kimia Organik dan Laboratorium Biomedik Universitas Brawijaya Malang dalam kurun waktu 6 bulan. Tahapan penelitian terdiri atas tiga tahap yaitu ekstraksi kulit batang kamboja, uji antioksidan, dan uji sitotoksik terhadap sel HeLa.

Ekstraksi Kulit Batang Kamboja.

Kulit batang kamboja diambil dari pohon kamboja yang berusia tua dari pemukiman Kelurahan Penanggungan Kota Malang. Pohon kamboja dideterminasi terdahulu di Laboratorium Taksonomi Jurusan Biologi Universitas Brawijaya. Kulit batang kamboja dikering anginkan pada temperatur ruang. Kulit batang yang telah dikeringkan dihaluskan dengan grinder dan diayak dengan ukuran 100 mesh.

Serbuk kulit batang kamboja kering ditimbang sebanyak 100 gram selanjutnya diekstraksi dengan metode maserasi bertingkat. Serbuk kulit batang kamboja dimasukkan ke dalam maserator dan direndam dengan petroleum eter sebanyak 200 mL selama 5 jam pada temperatur ruang. Residu dari hasil ekstraksi direndam dengan metanol 200 mL selama 24 jam pada temperatur ruang. Ekstraksi dengan metanol dilakukan sebanyak 3 kali ulangan. Filtrat hasil ekstraksi dengan metanol dipisahkan dan diuapkan sisa pelarutnya dengan *vacuum rotary evaporator*, hingga diperoleh ekstrak metanol kulit batang kamboja pekat.

Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Kulit Batang Kamboja. Aktivitas antioksidan dari ekstrak metanol kulit batang kamboja dilakukan dengan

menggunakan metode DPPH. Larutan uji berupa ekstrak metanol kulit batang kamboja yang dibuat seri konsentrasi 0-200 ppm. Serapan larutan sampel yang telah diberi 1,1-difenil-2-pikril hidrazil (DPPH) diamati absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Uji aktivitas antioksidan akan didapatkan nilai *Inhibitory Concentration 50%* (IC₅₀) yang dihitung menggunakan persamaan regresi linier. IC₅₀ adalah bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak ($\mu\text{g/ml}$) atau ppm yang mampu menghambat 50% oksidasi. Semakin kecil nilai IC₅₀ semakin tinggi aktivitas oksidan. Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC₅₀ kurang dari 50 ppm, kuat (50 ppm-100 ppm), sedang (100 ppm-150 ppm), dan lemah (151 ppm-200 ppm) (Butnariu & Grozea, 2012).

Uji Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Metanol Kulit Batang Kamboja terhadap Sel HeLa. Uji sitotoksik ekstrak metanol kulit batang kamboja terhadap sel HeLa dilakukan dengan metode *MTT assay*. Mengacu pada prosedur pengujian sel HeLa oleh Noor & Astuti (2014) sel HeLa dikultur dalam MEM, Fetal Bovine Serum (FBS) 10%, dan penisilin-streptomisin 2%. Ekstrak metanol kulit batang kamboja diujikan terhadap kultur sel HeLa. Pengujian ini menggunakan 96 *well plate* dengan dua jenis perlakuan dan 7 kali pengulangan.

1. Sumuran yang berisi sel HeLa sebanyak 2×10^4 sel/100 μL media kultur sebagai perlakuan kontrol negatif.
2. Sumuran yang berisi sel HeLa sebanyak 2×10^4 sel/100 μL media kultur yang ditambahkan ekstrak metanol kulit batang kamboja dengan konsentrasi 5 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 150 $\mu\text{g/mL}$, dan 200 $\mu\text{g/mL}$.

Mikroplate diinkubasikan selama 24 jam pada temperatur 37 °C dengan aliran

CO₂ 5 mL/menit. Setelah 24 jam ditambahkan reagen MTT sebanyak 10 µL ke dalam tiap sumuran. Sumuran diinkubasikan kembali pada inkubator CO₂ selama 4 jam, kemudian reaksi MTT dihentikan dengan cara menambahkan 100 µL sodium dodesil sulfat (SDS) 10%.

Mikroplate diinkubasikan kembali selama 12 jam pada temperatur ruang. Setelah 12 jam, absorbansi tiap sumuran dibaca dengan ELISA-reader pada panjang gelombang 570 nm.



Gambar 1. Pohon kamboja (*Plumeria acuminata*) dan kulit batang kamboja

HASIL DAN PEMBAHASAN

Metode yang digunakan untuk ekstraksi metabolit sekunder dalam kulit batang kamboja adalah maserasi (perendaman) bertingkat dengan pelarut petroleum eter dan metanol. Perendaman simplisia dengan pelarut yang sesuai akan menyebabkan terjadinya pemecahan dinding maupun membran sel dan terjadi perbedaan tekanan di dalam dan luar sel, sehingga senyawa metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dengan pelarut organik (Hanani, 2014).

Petroleum eter merupakan pelarut non polar yang memiliki kemampuan mengekstraksi lemak. Pelarutan lemak tersebut akan memisahkan senyawa non polar dari senyawa target golongan flavonoid yang bersifat polar. Keberadaan lemak di luar membran sel dapat dilarutkan terlebih dahulu dengan petroleum eter. Ampas yang dihasilkan diekstrak kembali dengan metanol, agar diperoleh ekstrak methanol bebas lemak. Menurut Markham (1988), senyawa golongan flavonoid mempunyai sejumlah gugus hidroksil

sehingga bersifat polar. Rendemen ekstrak metanol kulit batang kamboja yang didapatkan sebesar 24,7%.

Metode yang digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan ekstrak metanol kulit batang kamboja berdasarkan serapan radikal DPPH. Metode DPPH merupakan metode yang mudah, sederhana, menggunakan jumlah sampel yang sedikit, dan dapat digunakan untuk sampel padat maupun cair (Tristantini *et al.*, 2016). Pengukuran aktivitas antioksidan senyawa fenolik ekstrak metanol kulit batang kamboja mengakibatkan terjadinya perubahan warna pada larutan DPPH dalam metanol yang semula berwarna ungu menjadi kuning pucat seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak yang diberikan.

Senyawa DPPH berwarna ungu karena adanya delokalisasi elektron pada atom nitrogen yang semula (N-N) menjadi (N=N). Hal tersebut mengakibatkan ikatan rangkap terkonjugasi lebih panjang sehingga panjang gelombang DPPH bergeser ke panjang gelombang yang lebih panjang. Perubahan warna pada larutan

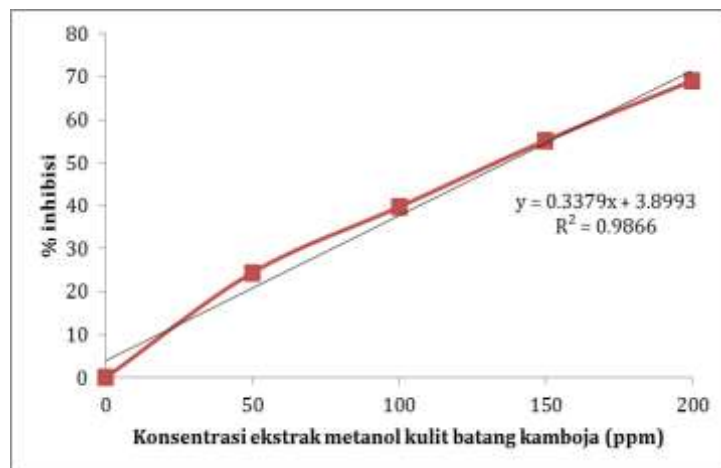
DPPH yang dicampur dengan ekstrak uji disebabkan oleh reaksi antara molekul difenil pikril hidrazil dan atom hidrogen yang dilepaskan satu molekul fenolik sehingga membentuk senyawa difenil pikril hidrazil berwarna kuning.

Berdasarkan hasil pengukuran serapan larutan sampel dan DPPH diperoleh nilai absorbansi larutan sampel, dimana selanjutnya dapat dihitung nilai persen inhibisi (aktivitas antioksidan).

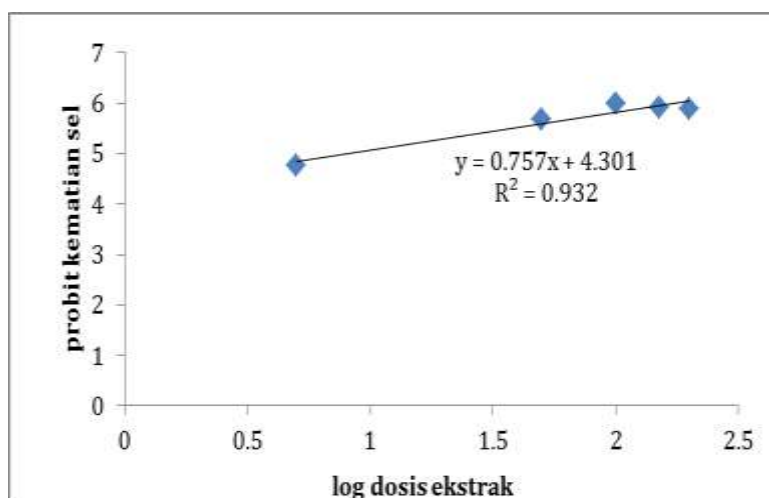
$$\% \text{ inhibisi} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100\%$$

Selanjutnya dibuat kurva linier hubungan antara persen inhibisi (y) dengan konsentrasi ekstrak (x), diperoleh

persamaan regresi $y = 0,3379x + 3,8993$ (Gambar 2). Nilai *Inhibitory Concentration 50%* (IC_{50}) menunjukkan konsentrasi ekstrak metanol kulit batang kamboja yang dapat menghambat proses oksidasi 50%. Berdasarkan persamaan tersebut, nilai IC_{50} dari ekstrak metanol kulit batang kamboja sebesar 136,43 ppm. Izzati *et al.* (2012) menyatakan bahwa suatu bahan dikategorikan sebagai antioksidan apabila memiliki nilai IC_{50} dibawah 200 ppm. Hal ini membuktikan bahwa ekstrak metanol kulit batang kamboja bersifat antioksidan.



Gambar 2. Kurva hubungan Inhibisi Oksidasi (%) dengan konsentrasi ekstrak (ppm)



Gambar 3. Kurva analisa probit LC₅₀ ekstrak metanol kulit batang kamboja terhadap sel heLa

Studi untuk mempelajari proliferasi, viabilitas, dan mortalitas sel dalam rangka pengukuran aktivitas senyawa antikanker membutuhkan keakuratan kuantifikasi jumlah sel hidup dalam kultur. Uji MTT merupakan uji yang sensitive, kuantitatif, dan terpercaya. Reaksi MTT merupakan reaksi reduksi seluler yang berdasarkan pada pemecahan garam tetrazolium MTT yang berwarna kuning menjadi Kristal formazan yang berwarna biru keunguan. Enzim suksinat dehydrogenase pada mitokondria sel hidup mampu memecah MTT menjadi kristal formazan. Chueahongthong *et al.* (2011) menuliskan bahwa reaksi tersebut melibatkan pirimidin nukleotida kofaktor NADH dan NADPH yang hanya dikatalisis oleh sel hidup, sehingga jumlah formazan yang terbentuk sama dengan jumlah sel yang hidup. Semakin banyak sel yang hidup, semakin banyak kristal formazan yang terbentuk, semakin tinggi nilai absorbansi yang diperoleh dan mengindikasikan mortalitas yang rendah. Perhitungan persen mortalitas sel HeLa dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ mortalitas} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100\%$$

Berdasarkan data absorbansi yang diperoleh, dibuat kurva hubungan antara

persen mortalitas sel (y) dengan log dosis ekstrak metanol kulit batang kamboja (Gambar 3), didapatkan persamaan regresi $y = 0,757x + 4,301$. Nilai *Lethal Concentration 50%* (LC₅₀) yang didapatkan adalah 8,38 ppm.

Baliano *et al.* (2016) menyatakan bahwa apabila nilai LC₅₀ < 30 ppm maka zat tersebut bersifat sitotoksik dan berpotensi sebagai bahan antikanker. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa ekstrak metanol kulit batang kamboja memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker leher rahim.

KESIMPULAN

Ekstrak metanol kulit batang kamboja memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar 136,43 ppm. Nilai LC₅₀ ekstrak metanol kulit batang kamboja terhadap sel HeLa sebesar 8,38 ppm sehingga bersifat sangat toksik dan berpotensi sebagai bahan antikanker leher rahim. Pada penelitian selanjutnya perlu dilakukan analisa kandungan senyawa aktif dan hubungan kuantitatif aktivitas strukturnya sebagai bahan antikanker.

DAFTAR PUSTAKA

Baliano, A. P., Pimentel, E. F., Buzin, A. R., Vieira, T. Z., Romão, W., Tose, L. V., Endringer, D.C, 2016. Brown seaweed

- Padina gymnospora is a prominent natural wound-care product. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 26(6), 714–719.
- Butnariu, M., & Grozea, L., 2012. Antioxidant (Antiradical) compounds. *Journal of Bioequivalence and Bioavailability*, 4(6), 4–6.
- Chueahongthong, F., Ampasavate, C., Okonogi, S., Tima, S., & Anuchapreeda, S., 2011. Cytotoxic effects of crude kaffir lime (*Citrus hystrix*, DC.) leaf fractional extracts on leukemic cell lines. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(14), 3097–3105.
- Gupta, M., Mazumder, U., Gomathi, P., & Selvan, V.T., 2006. Antiinflammatory evaluation of leaves of *Plumeria acuminata*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6(1), 6–36.
- Izzati, N. N., Diniatik, & Rahayu, W.S., 2012. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Perasan Daun Manggis (*Garcinia mangostana* L.) Berdasarkan Metode DPPH (2,2 Diphenyl-1-phydryl hydrazil). *Jurnal Ilmiah Farmasi*, 9(3), 111–121.
- Kessler, T.A., 2017. Cervical Cancer: Prevention and Early Detection. *Seminars in Oncology Nursing*, 1–12.
- Markham K., 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Penerbit Padmawinata. Bandung.
- Noor, R., & Astuti, I., 2014. Cytotoxicity Of A-Terpineol In Hela Cell Line And Its Effects To Apoptosis And Cell Cycle. *J Med Sci*, 46(1), 1–9.
- Rasjidi, I., 2009. Epidemiologi Kanker Serviks, III(3), 103–108.
- Sawaya, G.F., 2017. Cervical Cancer Screening. *Medical Clinics of NA*.
- Sulistiowati, E., Lolong, D. B., & Pangaribuan, L. (2016). Gambaran Penyebab Kematian Karena Kanker Di 15 Kabupaten/Kota Indonesia Tahun 2011 (Profiles the Causes of Cancer Deaths in 15 Districts/Municipalities, Indonesia Year 2011), 2011(29).
- Taupiqurrohman, O., Yusuf, M., Nuswantara, S., & Subroto, T., 2016. Potensi Gen Oncoprotein Human Papillomavirus Tipe 16 Sebagai Kandidat Vaksin Kanker Serviks. *Mkb*, 48(35), 84–91.
- Tristantini, D., Ismawati, A., Pradana, B. T., & Gabriel, J., 2016. Pengujian Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH pada Daun Tanjung (*Mimusops elengi* L), 1–7.