

PENGARUH INTERVAL DOSIS 2,44-19,53 µg/mL EKSTRAK N-HEKSANA DARI HYDROID *Aglaopheniakupressina* LAMOUREOUX TERHADAP AKTIVITAS PERTUMBUHAN SELHELA

THE INFLUENCE OF DOSE INTERVAL 2.44-19.53 µg / mL N-HEKSANA EXTRACT FROM HYDROID *Aglaopheniakupressina*LAMOUREOUX ON ACTIVITIES OF HELA CELL GROWTH

Sjafaraenan, Eva Johannes, Siti Nadya Wulandari

Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Penegtahuan Alam
Universitas Hasanuddin, Makassar
enan.gidinnur@gmail.com

Abstrak

Aglaophenia cupressina Lamouroux adalah salah satu spesies Hydroid yang ada di perairan pantai Indonesia yang hidup melekat pada substrat berupa sponge dan karang. Berdasarkan penelitian sebelumnya, diketahui *Aglaophenia cupressina* Lamouroux mengandung 3 golongan senyawa dari hasil fraksi N-Heksana yaitu asam heksadekanoat, β-sitosterol dan senyawa alkaloid baru yang diberi nama Aglao E. Unhas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik ekstrak Hydroid *Aglaophenia cupressina* Lamouroux dengan menggunakan N-Heksana sebagai bahan pelarut. Uji sitotoksik dilakukan menggunakan metode MTT (Methylthiazol Tetrazolium) terhadap sel HeLa. Hasil uji MTT menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa yaitu nilai IC₅₀= 2,7941 µg/mL, sehingga dinyatakan bahwa ekstrak Hydroid *Aglaophenia cupressina* Lamouroux menggunakan pelarut N-Heksana memiliki kemampuan antikanker yang baik.

Kata kunci: *Aglaophenia cupressina* Lamouroux, N-Heksana, Sitotoksik, Sel HeLa, Uji MTT.

Abstract

Aglaophenia cupressina Lamouroux is one of the Hydroid species that exist in Indonesia coastal waters and live by attaching to the substrate of sponge and corals. Based on previous research, it is known that *Aglaophenia cupressina* Lamouroux contains three groups of compounds from N-Hexane Fraction, there are Hexadecanoat Acid, β-sitosterol and a new alkaloid compound named Aglao E. Unhas. This research aimed to find out the cytotoxic activity of Hydroid *Aglaophenia cupressina* Lamouroux extract by using N-Hexane as the solvent. Cytotoxic test was performed using MTT Method on HeLa cell. MTT test results showed that cytotoxic activity against HeLa cell is IC₅₀= 2,7941 µg/mL. So it is stated that Hydroid *Aglaophenia cupressina* Lamouroux extract by using N-Hexane as the solvent has good anticancer ability

Key word: *Aglaophenia cupressina* Lamouroux, N-Hexane, Cytotoxic, HeLa Cell, MTT test.

Pendahuluan

Sampai saat ini, kanker masih menjadi penyebab kematian tertinggi di dunia dikarenakan keganasan pertumbuhan sel yang tak terkontrol sehingga merusak sel normal lainnya pada penderita. Predisposisi genetik, faktor lingkungan dan gaya hidup adalah faktor utama penyebab munculnya kanker. Ada beberapa orang yang sejak lahir telah membawa mutasi gen tertentu yang dapat mengarah ke pertumbuhan sel kanker. Seorang wanita lahir dengan mutasi pada gen yang disebut BRCA1 akan terjangkit kanker payudara atau rahim jauh lebih banyak daripada wanita yang tidak mempunyai mutasi demikian. Namun ada pula seseorang yang menderita kanker dikarenakan gaya hidup yang tidak sehat (Nurhayati dan Lusiyanti, 2006).

Ciri-ciri adanya sel kanker dalam tubuh seseorang jarang diketahui bahkan hampir tak terlihat, karena dampak negatif dari pembelahan sel kanker memberikan efek setelah melalui rentang waktu yang cukup panjang. Rata-rata 70% penderita penyakit ini ditemukan dalam keadaan stadium yang sudah lanjut. Kenyataan di lapangan, rata-rata >50% wanita Indonesia penderita kanker serviks maupun kanker payudara yang berobat ke dokter sudah dalam keadaan stadium lanjut (Oemiati *et al.*, 2011).

Berdasarkan data Depkes (2013), diketahui terdapat 529.828 kasus baru kanker serviks. Sebagian besar kasus dan kematian akibat karsinoma serviks terjadi di negara berkembang. Faktor penyebab kanker dapat terjadi secara internal dan eksternal. Faktor internal terutama keberadaan gen dan onkogen. Sedangkan faktor eksternal meliputi transmisi *Human Papilloma Virus (HPV)* yang terjadi akibat kontak seksual dibawah umur 20 tahun, sehingga terjadi penonjolan akibat iritasi virus dan mengalami pertumbuhan sel yang tidak terkendali ke jaringan lainnya (metastasis).

Sejak tahun 1950-an, pengobatan andalan terhadap kanker termasuk kanker serviks adalah dengan kemoterapi. Meskipun pengobatan kanker saat ini telah jauh lebih baik daripada sepuluh tahun yang lalu, tetap saja memerlukan pendekatan dan perbaikan disana-sini. Efek samping dapat membuat badan tidak enak, bahkan dapat menyebabkan kematian. Pil, penembakan dan penyuntikan intravena merupakan cara untuk membawa obat kemoterapi ke dalam tubuh (Nurhayati dan Lusiyanti, 2006). Namun, penggunaan kemoterapi dan radiasi dalam pengobatan kanker ternyata tidak memberikan hasil yang signifikan dan memuaskan dalam melakukan apoptosis sel kanker. Yang ada justru membahayakan sel dan jaringan normal penderita karena terus-menerus terpapar radiasi secara intens dalam jangka waktu yang panjang serta biaya pengobatan yang mahal (Heti, 2008). Maka dari itu, selama bertahun-tahun telah banyak dilakukan penelitian uji potensi obat antikanker dari bahan-bahan alam. Mulai dari tumbuhan hingga biota laut telah teruji secara *in vitro* mampu meminimalisir pertumbuhan dan/atau pembelahan sel kanker. Salah satunya yaitu Hydroid (phylum Coelenterata) yang merupakan hewan invertebrata laut yang bersimbion pada sponge dan kaya senyawa bioaktif seperti alkaloid, steroid, dan asam karboksilat yang dapat dimanfaatkan sebagai antimikroba (Johannes, 2008).

Pada penelitian Johannes *et al.*, (2017) dapat dilihat aktivitas sitotoksik fraksi metanol hydroid *Aglaophenia cupressina* Lamouroux terhadap *Artemia salina* dan sel tumor Hela diperoleh nilai LC₅₀ secara berurutan adalah 19.70 µg/mL dan 9.11 µg/mL. Dari hasil uji tersebut menunjukkan bahwa ada pengaruh toksisitas dari ekstrak hewan hydroid *Aglaophenia cupressina* terhadap penyakit kanker. Berdasarkan fakta tersebut, maka dilakukanlah penelitian ini dengan tujuan untuk mengetahui apakah Hydroid *Aglaophenia cupressina* Lamouroux juga memiliki efek sitotoksik terhadap sel HeLa penyebab kanker serviks.

Metode Penelitian

1. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan di Pulau Samalona, Kecamatan Ujung Tanah, Kota Makassar, Sulawesi selatan.

2. Ekstraksi Hydroid *Aglaophenia cupressina* Lamouroux

Sampel Hydroid *Aglaophenia cupressina* Lamouroux dibersihkan kemudian dikeringkan. Kemudian sampel yang telah kering dipotong-potong. Sampel yang telah dipotong, ditimbang sebanyak 500 gram. Lalu diblender agar sampel semakin halus. Sampel kemudian dimaserasi dengan menggunakan larutan N-Heksana selama 3x24 jam. Ekstrak yang diperoleh kemudian dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* selama ± 2 jam pada suhu 60-69°C. Suhu tersebut ditentukan agar senyawa dalam ekstrak tidak terdegrasi dan juga suhu 69°C merupakan titik didih larutan N-Heksana. Hasil akhir dari proses evaporasi adalah ekstrak kental Hydroid *Aglaophenia cupressina* Lamouroux dengan berat 3,65 gram yang ditimbang dengan timbangan analitik.

3. Pembuatan Media Kultur

Media yang digunakan adalah RPMI 1640 dan ditambahkan *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%, Penisilin-Streptomycin 1% dan NaCHO₃ 1,5% agar media kultur bersifat basa.

4. Thawing dan Inkubasi Sel HeLa

Sel HeLa yang ada di dalam *cryotube* dikeluarkan dari freezer ditambahkan media RPMI 4 mL lalu di sentrifugasi pada kecepatan 1800 rpm selama 5 menit. natant sel HeLa ditambahkan media RPMI sebanyak 4 mL sentrifugasi kembali. natant sel HeLa dipindahkan di cawan petri yang sudah berisi media RPMI 1640 dan antibiotik Penisilin-Streptomycin lalu diinkubasi dalam inkubator CO₂5% dengan suhu 37°C selama 24 jam.

Selama proses perbanyakan sel HeLa berlangsung, selain inkubasi dilakukan pula proses penggantian media kultur.

5. Pembuatan Senyawa Uji

Ekstrak Hydroid *Aglaophenia cupressina* Lamouroux diambil sebanyak 0,1 gram lalu dicampurkan media RPMI 1640 10 mL. Campuran ekstrak dan media kemudian di vortex hingga larut lalu di taruh di *freezer* selama 24 jam. Selanjutnya disaring ke *conical tube* yang baru menggunakan *disposable, minisart filter unit* dan *conical tube* hingga senyawa uji memiliki tingkat konsentrasi 10.000 µg/mL. Perhitungan pemberian seri dosis adalah pembagian kelipatan 2 sebanyak 12 kali.

Larutan uji dibuat sesuai dengan konsentrasi dari seri dosis 5000 µg/mL, 2500 µg/mL, 1250 µg/mL, 625 µg/mL, 312,5 µg/mL, 156,25 µg/mL, 78,125 µg/mL, 39,06 µg/mL, 19,53 µg/mL, 9,76 µg/mL 4,88 µg/mL dan 2,44 µg/mL. Larutan uji diperoleh dengan melakukan pengenceran antara senyawa uji dengan media RPMI 1640 yang baru.

6. Panen Sel HeLa

Cawan petri yang berisi kultur sel HeLa kemudian diinkubasi di inkubator CO₂5% dengan suhu 37°C sampai sel menjadi konfluen untuk diujikan setelah itu dilakukan perhitungan sel menggunakan *cell counter*. Perhitungan sel dilakukan dimulai dengan mengambil kultur sel sebanyak 10µL menggunakan mikropipet lalu dicampur dengan Trypan

Blue. Campuran tersebut kemudian disuntikkan ke dalam *slide card* lalu dimasukkan ke dalam Cell Counter. Jumlah sel HeLa yang berhasil bertahan hidup adalah $3,47 \times 10^6$ sel/mL dari total $4,31 \times 10^6$ sel/mL

7. Uji Sitotoksik dengan Metode MTT (Methylthiazol Tetrazolium)

Sel HeLa yang telah diinkubasi dikeluarkan dari media RPMI 1640. ditambahkan tripsin 2 mL, diinkubasi 5 menit kemudian siapkan *96-well microplate* untuk proses pemindahan sel.

Sel HeLa dipindahkan ke dalam sumuran *96-well microplate* dengan jumlah sel yaitu 6×10^3 sel/mL. Sel didalam sumuran ditambahkan media RPMI 1640 sebanyak 100 μ L diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO₂ 5%.

Setelah diinkubasi, media RPMI dibuang, senyawa uji dipindahkan ke sumuran *96-well microplate* masing-masing sebanyak 200 μ L. MTT (5 mg/1 mL PBS) di vortex tambahkan MTT 25 μ L ke tiap sumuran. ditetaskan MTT pada sumuran kontrol sel yang berisi media kultur RPMI 1640 dan sel HeLa serta kontrol media yang berisi media kultur RPMI 1640. linkubasi 4 jam dalam inkubator CO₂5% dengan suhu 37°C. Hasil dari inkubasi penambahan MTT kemudian dihentikan dengan cara menambah 50 μ L *Sodium Dedosil Sulfate* (SDS) 10% di setiap sumuran. Absorbansi tiap sumuran dibaca dengan *ELISA reader* dengan panjang gelombang 595 nm.

8. Analisis Data

Kematian Sel HeLa dihitung berdasarkan besarnya viabilitas sel. Penentuan persentase kematian sel dihitung berdasarkan rumus :

$$\% \text{ viabilitas sel} = \frac{A-B}{C-B} \times 100\%$$

Ket: A = Absorbansi kontrol
perlakuan

B = Absorbansi kontrol media

C = Absorbansi kontrol sel

Potensi ekstrak *Aglaophenia cupressina* Lamouoroux dalam menghambat atau membunuh sel HeLa dapat diketahui dengan menghitung nilai IC₅₀ menggunakan analisa *regression linier* pada Microsoft Excel untuk konsentrasi dosis 2,44 μ g/mL – 19,53 μ g/mL. Data yang diperoleh dari hubungan antara log konsentrasi dengan persentase viabilitas sel, lalu dibuat grafik menggunakan *chart type scatter*. Selanjutnya dicari persamaan regresi linier dari grafik tersebut dengan menampilkan *add treadline*-regresi linier. Lalu masukkan rumus $y = 50\%$ pada persamaan regresi linier dan cari nilai x sehingga diperoleh nilai IC₅₀.

Hasil Dan Pembahasan

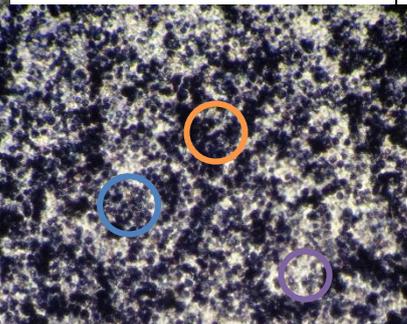
1. Hasil

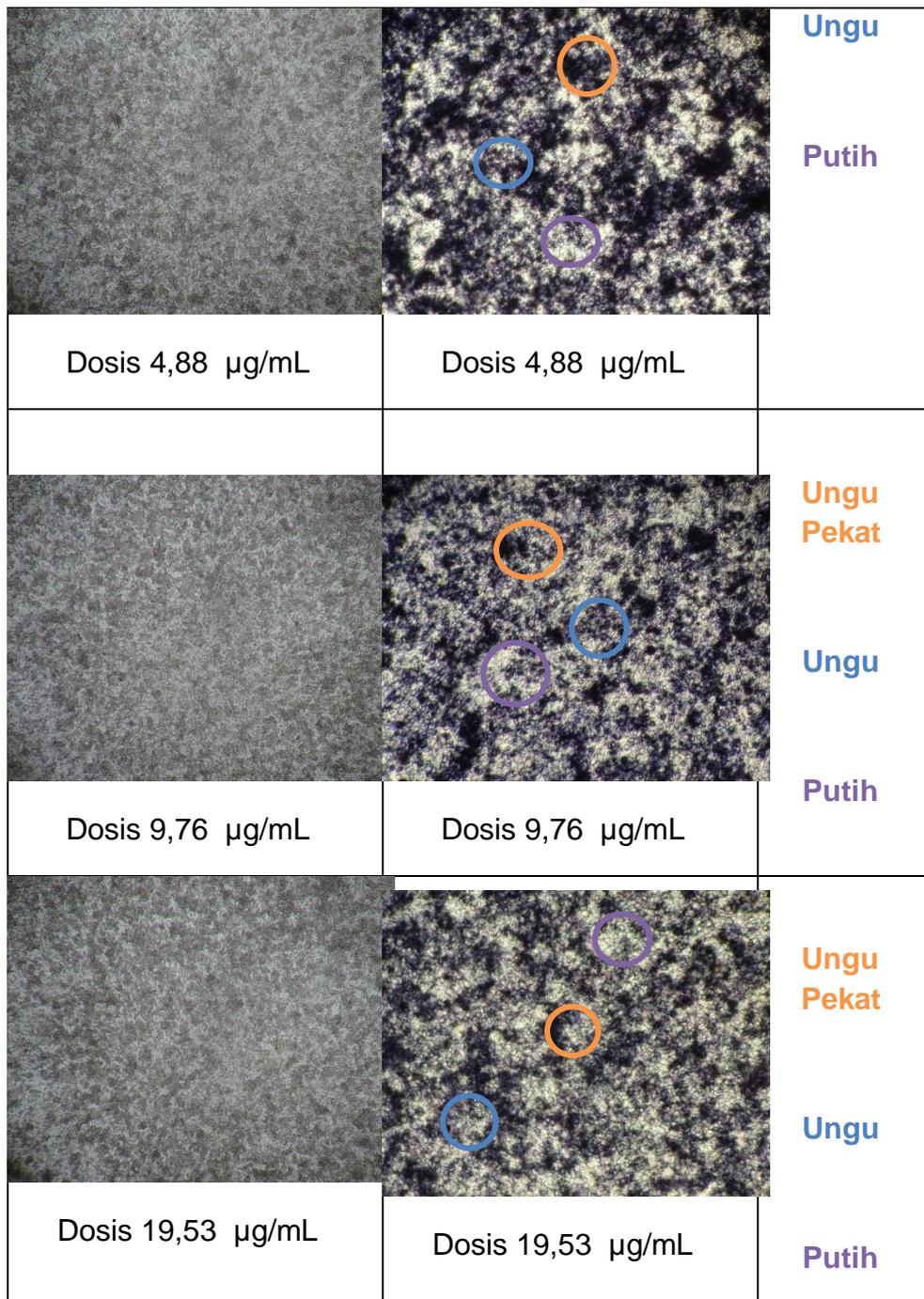
Hasil dari pembacaan absorbansi ELISA Reader terhadap reaksi ketiga kontrol tersebut terhadap garam MTT selanjutnya dihitung menggunakan rumus statistika untuk mencari persentase (%) viabilitas sel.

Tabel 1. Hasil Pembacaan Absorbansi dengan ELISA Reader

No	K.Med	K.Sel	Dosis ($\mu\text{g/mL}$)			
			2,44	4,88	9,76	19,53
1	0,058	0,920	1,040	1,040	1,040	1,040
2	0,059	0,913	0,818	0,818	0,818	0,818
3	0,057	1,020	1,240	1,240	1,240	1,240
Jumlah	0,174	2,853	3,098	3,098	3,098	3,098
Mean	0,058	0,951	1,033	1,033	1,033	1,033
Jumlah % Sel Hidup			109,15	109,15	109,15	109,15

Berdasarkan tabel data perhitungan persentase sel hidup, absorbansi tiga kali ulangan terlihat tidak berbeda nyata dari setiap konsentrasi seri dosis yang diujikan oleh metode MTT. Nilai tiga kali perlakuan terhadap ketiga kontrol tersebut menunjukkan bahwa sel HeLa tetap berproliferasi terhadap kandungan senyawa yang ada pada ekstrak Hydroid *Aglaophenia cupressina* Lamouroux. Semakin banyak sel yang mampu bertahan hidup, semakin banyak kristal formazan yang terbentuk. Pembacaan melalui panjang gelombang 595 nm dilakukan karena warna ungu yang tampak akan menyerap warna kuning dari spektrum cahaya yang berhasil diamati (Laila, 2016). Hasil akhir data yang dihasilkan berkorelasi langsung dengan viabilitas sel, sehingga dapat dikatakan bahwa melalui nilai absorbansi dapat diketahui pula potensi sampel dalam menghambat sel HeLa. (Gambar 1)

Morfologi Sel HeLa sebelum Pemberian MTT	Morfologi Sel HeLa setelah Pemberian MTT	Keterangan
		Ungu Pekat
Dosis 2,44 $\mu\text{g/mL}$	Dosis 2,44 $\mu\text{g/mL}$	Ungu
		Putih
		Ungu Pekat



Gambar 1: Pertumbuhan Sel Hela dalam berbagai dosis

Pada dosis terendah yaitu 2,44 µg/mL, efek toksik dari ekstrak masih rendah disebabkan kristal formazan (paramater warna ungu) banyak yang terbentuk. Adapun sel yang berwarna pucat, hal tersebut dikarenakan sel HeLa mengalami inhibisi sebagai akibat dari efek sitotoksik senyawa ekstrak. Hasil ini juga terjadi pada dosis 4,88 µg/mL, yang mendominasi justru sel yang mampu bertahan hidup. Sehingga bisa dikatakan bahwa pada seri dosis 2,44-4,88 µg/mL, lebih banyak sel yang hidup pada dosis ekstrak yang rendah dibandingkan dengan sel yang mati dikarenakan pengaruh dari sifat sitotoksik ekstrak *Aglaophenia cupressina* Lamouroux.

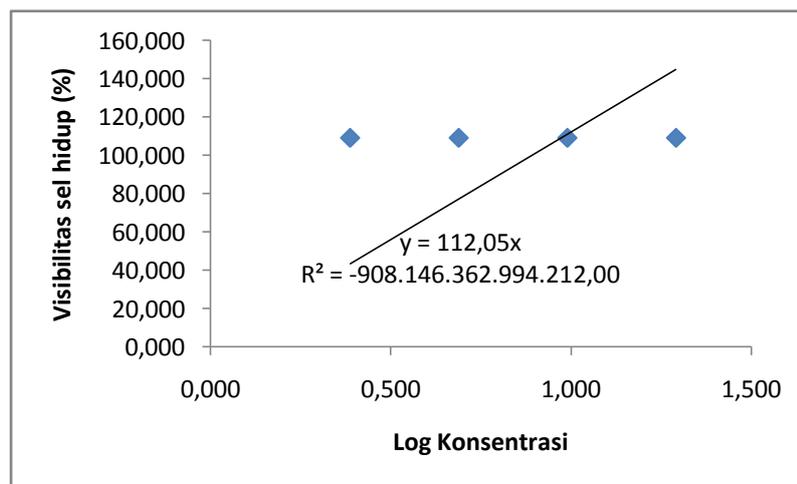
Pada penelitian ini, semakin tinggi konsentrasi larutan uji semakin sedikit kandungan kristal formazan yang terbentuk. Seri dosis 9,76 µg/mL misalnya, terlihat sel HeLa mulai

bereaksi terhadap senyawa toksik dari ekstrak *Aglaophenia cupressina* Lamouroux. Hal ini bisa dilihat secara kualitatif dari warna ungu yang mulai sedikit. Hasil ini menunjukkan bahwa sifat toksik dari senyawa ekstrak mulai mampu menghambat viabilitas sel HeLa. Lalu pada dosis tertinggi terakhir 19,53 µg/mL, sel HeLa semakin mengalami penghambatan hingga kematian dilihat dari semakin banyaknya sel yang berwarna pucat setelah penambahan reagen MTT. Hasil tersebut menunjukkan bahwa peningkatan dosis kontrol perlakuan yang terdiri dari 200 µL senyawa uji dan 6×10^3 sel/mL sel HeLa dalam penelitian ini memberikan efek sitotoksik yang lebih tinggi pula terhadap sel HeLa. (Tabel 2)

Tabel 2. Log Konsentrasi Seri Dosis Ekstrak *Aglaophenia cupressina* Lamouroux

Konsentrasi (µg/mL)	Logkonsentrasi	Visibilitas sel hidup (%)
19,53	1,291	109,145
9,76	0,989	109,145
4,88	0,688	109,145
2,44	0,387	109,145

Dari tabel 2, terlihat bahwa dosis dengan konsentrasi yang berbeda viabilitas sel hidup diatas 100%. Hubungan antara konsentrasi dengan viabilitas dapat dilihat pada Gambar 2



Gambar 2: Grafik Hubungan Log Konsentrasi dengan Visibilitas Sel

Secara kuantitatif, data mengenai kemampuan sitotoksik ekstrak *Aglaophenia cupressina* Lamouroux terhadap viabilitas sel HeLa dapat dilihat dari analisis probit untuk selanjutnya diperoleh nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} adalah nilai kemampuan konsentrasi suatu ekstrak dalam menghambat proses biologis metabolisme sel. Nilai IC_{50} diperoleh menggunakan analisis probit dan regresi linier, analisis probit biasa digunakan pada pengujian biologi untuk mengetahui respon objek yang diteliti terhadap adanya stimultan (Papatungan *et al.*, 2017).

Dari hasil pembacaan absorbansi dengan ELISA Reader pada panjang gelombang 595 nm dan persentase sel hidup, dilakukan perhitungan regresi linier menggunakan Microsoft Excel pada 4 seri dosis konsentrasi ekstrak *Aglaophenia cupressina* yaitu (2,44; 4,88; 9,76; 19,53) µg/ml lalu didapatkan persamaan linier $y = 112,05x$. Berdasarkan persamaan linier tersebut diperoleh nilai IC_{50} ekstrak N-Heksana *Aglaophenia*

cupressina Lamouroux yaitu 2,7941 µg/ml. Suatu ekstrak dinyatakan memiliki sifat sitotoksik jika nilai IC₅₀ kurang dari 1.000 µg/mL setelah 24 jam kontak dengan sel kanker (Megawati, 2014).

Berdasarkan data yang telah ada, maka ekstrak hydroid *Aglaophenia cupressina* Lamouroux menggunakan N-Heksana sebagai bahan pelarut berpotensi untuk dikembangkan sebagai pengobatan antikanker. Namun hasil ini belum dapat dikatakan maksimal karena hingga dosis tertinggi ekstrak yang diberikan dalam menghambat sel HeLa pada penelitian inipun tidak menyebabkan viabilitas sel menurun (persentase visibilitas sel HeLa terhadap keempat dosis sama-sama 109,145%). Sehingga dosis senyawa uji dari ekstrak N-Heksana *Aglaophenia cupressina* wajib ditingkatkan agar inhibisi sel melalui proses sitotoksik juga semakin besar.

Kesimpulan

Nilai IC₅₀ dari uji sitotoksik ekstrak Hydroid *Aglaophenia cupressina* Lamoureaux menggunakan pelarut N-Heksana terhadap sel HeLa melalui metode MTT (Methylthiazol Tetrazolium) yaitu 2,7941 µg/mL sehingga dapat dikatakan bahwa Ekstrak Hydroid *Aglaophenia cupressina* Lamoureaux berpotensi sebagai antikanker.

Daftar Pustaka

- Riset Kesehatan Dasar. 2013. Badan Litbangkes Kementerian Kesehatan RI dan Data Penduduk Sasaran, Pusdatin. Kementerian Kesehatan RI: Jakarta.
- Heti., D. 2008. Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol 70% Herba Sisik Naga (*Drymoglossum piloselloides* Presl.) terhadap Sel T47D. Universitas Muhammadiyah Surakarta: *Skripsi*.
- Johannes, E., 2012. Pemanfaatan Senyawa Bioaktif Hasil Isolasi Hydroid *Aglaophenia cupressina* Lamoureaux sebagai Bahan Sanitizer pada Buah dan Sayuran Segar. Universitas Hasanuddin Makassar: *Disertasi*.
- Johannes., E. Sjaforaenan *et al.*, 2017. Cytotoxic Activity of Methanol Fraction Hydroids *Aglaophenia cupressina* Lamoureaux Against HeLa Tumor Cells. RJPBCS 8(3) : Page 195.
- Laila., A., K. 2016. Uji Aktivitas Antikanker Payudara (T47D) Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) yang Diembangkan pada Zeolit NaX. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang : *Skripsi*.
- Megawati, L. 2014. Uji Aktivitas Ekstrak Biji Sirsak (*Annona muricata* Linn.) terhadap Beberapa Sel Kanker Manusia secara In Vitro. Universitas Airlangga: *Skripsi*
- Nurhayati., S. Lusiyanti., Y. 2006. Apoptosis dan Respon Biologi Sel sebagai Faktor Prognosa Radioterapi Kanker. Buletin Alara. Volume 7 No. 3, April 2006 : 57–66.
- Oemiati., R. Rahajeng., E. *et al.* 2011. Prevalensi Tumor Dan Beberapa Faktor yang Mempengaruhinya di Indonesia. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Vol. 39, No.4, 2011: 190-204.

Paputungan., W., A. Rotinsulu., H. Yamlean., P., V. Standarisasi Parameter Spesifik dan Uji Aktivitas Antikanker terhadap Sel Kanker Kolon (WiDr) dari Ekstrak Etanol Lamun (*Enhalus acoroides*). Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi – Unsrat Vol. 6 No. 3.

Rosdiana., A. Hadisaputri., Y., E. 2016. Studi Pustaka tentang Prosedur Kultur Sel. Farmaka. Volume 4 No.3 Suplemen 1.