

Potensi Antiproliferasi Fraksi sari Ekstrak Metanol Daun Botto-botto (*Chromolaena odorata* L.) Terhadap Sel HeLa

Antiproliferation potential of Botto-botto (*Chromolaena odorata* L.) leaves methanol extract fraction against HeLa Cell Line

Muhammad Rusdi, Haeria, Nursalam Hamzah, Afrisusnawati Rauf, Faradibha Amriani

Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar,
Jl H.M. Yasin Limpo No.36 Kecamatan Sombaopu Kabupaten Gowa, Sulawesi Selatan

Kontak korespondensi: muhammad.rusdi@uin-alauddin.ac.id

ABSTRAK

Botto-botto (*Chromolaena odorata* L.) adalah salah satu tanaman yang secara empiris digunakan daunnya oleh masyarakat Sulawesi Selatan sebagai obat luka dan antiinflamasi. Penelitian ini bertujuan untuk menguji potensi antiproliferasi ekstrak metanol daun Botto-botto terhadap sel kanker (HeLa) dan sel normal (Vero) dengan metode MTT (*Microculture Tetrazolium Salt*). Daun kering diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol, filtrat kemudian dikeringkan. Ekstrak kemudian dipartisi dengan pelarut etil asetat. Ekstrak etil asetat dari ekstrak metanol yang diperoleh difraksinasi menggunakan kromatografi kolom cair vakum menggunakan pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya. Setiap fraksi kemudian diuji aktivitas antiproliferasi menggunakan metode MTT pada sel kanker HeLa dan sel normal Vero dengan parameter persen penghambatan pertumbuhan sel. Indeks selektivitas dihitung dari rasio persen penghambatan pertumbuhan sel kanker dibanding sel normal. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa fraksi A, B, C, D, E, F, dan G dari hasil fraksinasi ekstrak etil asetat memiliki indeks selektivitas pada sel HeLa masing-masing sebesar 0,845; 3,387; 2,004; 1,508; 1,625; 1,284; 1,299. Hasil ini membuktikan bahwa fraksi B dari ekstrak metanol daun Botto-botto berpotensi dikembangkan sebagai agen kemoterapi dalam meningkatkan efektivitas pengobatan kanker leher rahim.

Kata Kunci: Antikanker, *Chromolaena odorata* Linn; Uji MTT; Sel HeLa

ABSTRACT

Botto-botto (Chromolaena odorata L.) was one of plants that its leaves used empirically in South Sulawesi society as wound and anti-inflammatory drugs. This study aimed to determine the potential of Botto-botto toward cancer cells (HeLa Cells) and normal cells (Vero cells) using the MTT assay method (Microculture Tetrazolium Salt Method). Ethyl acetate extract from methanol extract being fractionated by vacuum liquid chromatography method by a different polarity level of solvent. Cytotoxic effect test was using MTT method to cancer cells (HeLa), and normal cells (Vero) with the percent parameter of cell growth inhibition. Selectivity index was determined from percentage of cancer cell growth inhibition ratio of cancer cells to normal cells. The results showed that A, B, C, D, E, F, and G fractions had a selectivity index on HeLa cells at 0.845, 3.387, 2.004, 1.508, 1.625, 1.284, 1.299. This result proved that B fraction of methanol extract of Botto-botto leaves had a potential to be developed as chemotherapy agents in increasing the effectiveness treatment of cervix cancer.

Keywords: *Chromolaena odorata* L.; HeLa Cell Line; MTT Assay

PENDAHULUAN

Kanker adalah penyakit yang ditandai dengan pertumbuhan sel yang tidak

terkontrol. Diperkirakan ada kasus baru sekitar 18,1 juta dan kematian yang diakibatkan oleh penyakit ini sekitar 9,6 juta

jiwa dan lebih dari setengahnya akan terjadi di Asia pada tahun 2018 (Bray, et al., 2018). Salah satu kanker yang paling membahayakan adalah kanker leher rahim yang menempati peringkat kedua penyakit yang menimpa wanita di Indonesia. Kanker leher rahim (*cervix*) adalah kanker ganas yang berasal dari sel epitel skuamosa yang disebabkan oleh infeksi *Human Papilloma Virus (HPV)* (Andrijono, 2007).

Di Amerika, kanker leher rahim merupakan kanker urutan kedua yang membunuh wanita (Siegel, Miller, & Ahmedin Jemal, 2017). Di Indonesia, terdapat sekitar 32.469 kasus kanker leher rahim yang di diagnosa setiap tahunnya dan umumnya dialami wanita yang berusia 15 hingga 44 tahun (Bruni, et al., 2019).

Di dalam karsinoma leher rahim manusia terdapat sel yang mempunyai pembelahannya cepat dan mudah ditumbuhbiakan, yang dinamakan sel HeLa. Siklus sel Hela biasanya selama 20 jam dan bermitosis hanya satu jam (Marks & Mark, 2000). Sel ini dapat tumbuh secara agresif di media RPMI 1640-serum yang terdiri nutrisi (asam amino, vitamin, garam-garam anorganik, dan glukosa) serum yang mampu memacu pertumbuhan sel dan albumin sebagai kofaktor enzim (Freshney, 1986).

Kemoterapi merupakan terapi kanker yang masih digunakan sampai saat ini, akan tetapi masih menyisahkan masalah berupa efek samping obat. Anemia, neutropenia, dan trombositopenia dialami beberapa pasien

kanker di Filipina setelah pemberian kemoterapi. Hal ini menunjukkan kemoterapi dapat menginduksi timbulnya penyakit tersebut (Tia, Lui, Chua, & Strebel, 2015). Selain itu, pemberian kemoterapi ini paling menonjol pada sistem hematopietik dan saluran gastrointestinal (GI) dikarenakan jaringan ini cepat memperbarui dan memiliki kompartemen sel punca yang jelas yang memainkan peran penting dalam homeostasis, dan dalam cedera akut akibat pengobatan dosis terbatas (Yu, 2013)

Daun Botto-botto merupakan salah satu pengobatan alternatif yang digunakan oleh masyarakat Sulawesi selatan sebagai obat tradisional. Beberapa penelitian dari daun Botto-botto sebagai antikanker diantaranya ekstrak metanol daun Botto-botto menyebabkan penghambatan yang nyata terhadap sel kanker HT-29 (Adedapo, Oyagbemi, & Yakubu, 2016). Penelitian lain melaporkan bahwa ekstrak larut n-heksan memiliki aktifitas sitotoksik terhadap sel kanker Cal51, MCF7 dan MDAMB-468 (Kouamé, et al., 2013). Selanjutnya, fraksi C dari ekstrak etil asetat Botto-botto berpotensi sebagai agen anti kanker dengan aktivitas LC_{50} sebesar 4,697 $\mu\text{g/ml}$ terhadap *Artemia salina* Leach (Mukhriani, Edy, Ilyas, & Leboe, 2016). Dalam penelitian lainnya, ekstrak etil asetat daun Botto-botto memiliki aktivitas antiproliferasi terhadap sel leukemia L1210 dengan nilai IC_{50} sebesar 9,3 $\mu\text{g/mL}$ (Fitrah, 2016).

Penelitian beberapa aktivitas antikanker dari tanaman Botto-botto sangat bermanfaat dalam mengembangkan potensi tanaman obat ini, mengatasi efek samping obat dan menguatkan penelitian penelitian sebelumnya. Oleh karenanya, dilakukan penelitian potensi akitvitas farmakologis dari fraksi ekstrak etil asetat Daun Botto-botto.

METODOLOGI

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah alat maserasi, kolom cair vakum, *Laminar Air Flow*, hemasitometer, *ELISA reader*, *96 well plate*, inkubator CO₂, mikroskop, *rotavapor*, membran non pirogenik.

Bahan-bahan yang digunakan adalah daun Botto-botto, etil asetat, metanol, n-heksan, lempeng silika gel 60 F₂₅₄, sel normal (Vero), sel kanker *cervix* (HeLa), reagen MTT (3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida), media kultur (*RPMI 1640-serum*), *phosphate-buffered saline*, tripsin, reagen Dragendorf, Mayer, wagner, reagen Lieberman Bouchard, reagen AlCl₃, reagen FeCl₃, larutan SDS (10% *sodium dodecyl sulfate* yang dilarutkan dalam 0,01 N HCl)

Ekstraksi, Partisi dan Fraksinasi

Daun Botto-botto diambil di daerah Sungguminasa Kabupaten Gowa Provinsi Sulawesi Selatan. Daun dibersihkan, dikeringkan dan diserbukkan. Serbuk daun diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol. Remaserasi dilakukan sebanyak dua kali. Ekstrak cair

selanjutnya dipekatkan dengan *rotavapor* dan dikeringkan. Ekstrak metanol kering selanjutnya dipartisi dengan pelarut n-heksan. Ekstrak n-heksan disisihkan dan ekstrak yang tidak larut selanjutnya dipartisi dengan pelarut etil asetat dan filtrat dikeringkan. Ekstrak etil asetat difraksinasi dengan metode kromatografi cair vakum dengan menggunakan gradient kepolaran. Fraksi yang memiliki profil yang sama digabung menjadi fraksi gabungan.

Uji Aktivitas Penghambatan Sel Kanker

Penyiapan Sampel Uji

Sampel uji fraksi etil asetat (A, B, C, D, E, F, dan G) daun Botto-botto dibuat konsentrasi 500 ppm kemudian dimasukkan ke dalam sumuran *mikroplate* yang berbeda untuk pengujian terhadap sel HeLa

Pengujian Sampel dengan Metode MTT

Larutan stok MTT disiapkan dalam larutan buffer fosfat (PBS, pH 7,2)(50 mg/10 ml dan disaring dengan membran.

Suspensi sel HeLa sebanyak 100 µl ke dalam *96-well plate* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Sampel pengujian (500 ppm) ditambahkan ke dalam *96-well plate* dan diinkubasi selama 24 jam. Selanjutnya seluruh cairan *96-well plate* dibuang dan ditambahkan larutan MTT 10 µL dan medium RPMI 100 µL. Setelah inkubasi selama 4 jam pada 37 °C, ditambahkan 100 µL larutan SDS ke *96-well plate*. Setelah inkubasi selama 24 jam, *96-well plate* dibaca dengan *ELISA reader* pada 595 nm untuk memperoleh nilai

absorbansi. Pengujian ini juga dilakukan dengan prosedur yang sama untuk sel Vero.

Uji Identifikasi Golongan Senyawa

Fraksi etil asetat yang memiliki nilai selektifitas tinggi diidentifikasi golongan senyawanya menggunakan pereaksi warna. Pereaksi warna yang digunakan untuk mengidentifikasi golongan senyawa alkaloid, terpenoid, fenolik dan flavonoid.

Analisis Data

Nilai absorbansi yang diperoleh selanjutnya dihitung jumlah sel yang hidup (% SH) masing masing sampel uji. Selanjutnya persen penghambatannya (% IC) dihitung dengan rumus:

$$\% IC = \frac{\% SH_{kontrol} - \% SH_{sampel}}{\% SH_{kontrol}} \times 100\%$$

Selanjutnya dihitung indeks selektifitas (S) masing-masing sampel uji dengan rumus:

$$S = \frac{\% IC \text{ sel kanker Hela}}{\% IC \text{ sel Vero}}$$

Indeks selektifitas yang tinggi menunjukkan bahwa fraksi tersebut lebih efektif dalam menghambat sel kanker dan toksisitas yang rendah terhadap sel normal

(Vero).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Daun Botto-botto yang telah dikeringkan dan diserbukkan diekstraksi dengan metode maserasi. Beberapa penelitian sebelumnya menggunakan metode ini karena lebih sederhana dan mudah dalam pengerjaannya serta tekstur daun yang lunak sehingga tidak membutuhkan metode panas. Pelarut yang digunakan dalam mengekstraksi adalah metanol karena pelarut tersebut dapat menarik senyawa nonpolar dan senyawa polar. Rendamen ekstrak yang diperoleh sebesar 5,46 %. Ekstrak metanol yang sudah kering/kental sebanyak 24 g dipartisi dengan menggunakan pelarut n-heksan, sehingga diperoleh ekstrak yang tidak larut n-heksan dan ekstrak larut n-heksan. Ekstrak larut n-heksan disisihkan dan dikeringkan, diperoleh sebanyak 0,34 g. Ekstrak yang tidak larut n-heksan selanjutnya dipartisi menggunakan pelarut etil asetat. Diperoleh ekstrak etil asetat sebanyak 3,95 g. Ekstrak yang terlarut pada pelarut nonpolar (n-heksan) lebih sedikit dibandingkan yang terlarut pada ekstrak etil

Tabel 1. Persentase rendamen ekstrak, ekstrak partisi dan fraksinasi daun Botto-botto

Sampel	Berat (g)	Persen rendamen (%)
Ekstrak metanol	163,8	5,46
Ekstrak partisi n-heksan	0,34	1,41
Ekstrak partisi etil asetat	3,95	16,46
Fraksi A	0,099	2,51
Fraksi B	0,821	20,78
Fraksi C	0,765	19,36
Fraksi D	0,255	6,45
Fraksi E	0,121	3,06
Fraksi F	0,202	5,11
Fraksi G	0,425	10,76

Tabel 2. Persentase sel HeLa dan Vero hidup serta Selektivitas terhadap sel Hela

Sampel Uji	Sel Hela Hidup (%)	Sel Vero Hidup (%)	Indeks Selektivitas terhadap Sel Hela	Keterangan
Fraksi A	56,64	48,73	0,85	Tidak selektif
Fraksi B	77,23	93,28	3,39	Selektif
Fraksi C	24,89	62,54	2,00	Tidak selektif
Fraksi D	65,69	77,25	1,51	Tidak selektif
Fraksi E	61,03	76,02	1,63	Tidak selektif
Fraksi F	81,24	85,39	1,28	Tidak selektif
Fraksi G	25,18	42,44	1,30	Tidak selektif
Kontrol Positif	46,78	52,87		

asetat.

Berdasarkan penelitian sebelumnya, potensi antikanker paling besar adalah ekstrak etil asetat (Mukhriani, Edy, Ilyas, & Leboe, 2016; Fitrah, 2016). Oleh karenanya, ekstrak etil asetat difraksinasi dengan menggunakan kromatografi cair vakum. Eluen yang digunakan adalah n-heksan : etil asetat dan dilanjutkan dengan etil asetat : metanol dengan berbagai perbandingan. Pemilihan eluen dalam kromatografi kolom digunakan berdasarkan profil kromatografi, dan dimulai dari eluen yang sifatnya nonpolar sampai yang sifatnya polar. Hasil fraksinasi dari ekstrak etil asetat diperoleh 7 fraksi yaitu Fraksi A, B, C, D, E, F, dan G. Hasil ekstraksi, ekstrak partisi dan Fraksinasi Daun Botto-botto dapat dilihat pada tabel 1.

Fraksi A, B, C, D, E, F dan G selanjutnya diuji potensi farmakologinya, dalam hal ini pengujian aktivitas sitotoksik dengan metode *Microculture Tetrazolium Salt* atau MTT. MTT ini adalah metode kolorimetri, yang memiliki keakuratan yang tinggi, digunakan untuk mengetahui sitotoksik suatu senyawa. Adanya reaksi reduksi oleh sistem reduktase suksinat tetrazolium yang sifatnya larut air

(berwarna kuning) membentuk garam formazan yang tidak larut berwarna ungu) (Doyle & Griffiths, 2000).

Hasil uji sitotoksitas terhadap sel kanker Hela menunjukkan fraksi yang memiliki persentase sel mati yang paling tinggi adalah fraksi C sebesar 75,11 atau persentase sel hidupnya sebesar 24,89. Hasil uji sitotoksitas terhadap sel normal Vero menunjukkan Fraksi B memiliki presentase sel hidup yang paling tinggi yaitu sebesar 93,28 atau persentase sel matinya sebesar 6,72. Indeks selektifitas fraksi A, B, C, D, E, F dan G berturut turut sebesar 0,85; 3,39; 2,00; 1,51; 1,63; 1,28 dan 1,30. Hasil uji toksisitas dan indeks selektifitas fraksi dapat dilihat pada tabel 2.

Data diatas menunjukkan bahwa walaupun persentase kematian fraksi C yang paling tinggi, akan tetapi persentase kematian terhadap sel normal juga tinggi sehingga nilai selektifitasnya hanya sebesar 2,00. Sedangkan fraksi B memiliki selektifitas yang paling tinggi dengan nilai selektifitas sebesar 3,39. Nilai selektifitas dibawah 3 menunjukkan fraksi tersebut tidak selektif digunakan

Tabel 3. Identifikasi Golongan Senyawa dari Fraksi B

Pereaksi warna	Hasil	Keterangan
Dragendorf	+	terdapat endapan merah bata
Mayer	+	terdapat endapan putih
Wagner	-	Tidak terdapat endapan coklat
Lieberman Bouchardt	+	berubah warna menjadi kuning emas
AlCl ₃	-	Tidak berubah warna menjadi jingga
FeCl ₃	+	berubah warna menjadi hijau kehitaman

sebagai antikanker karena akan mengganggu sel normal.

Fraksi yang memiliki selektifitas tinggi (fraksi B) selanjutnya diidentifikasi golongan senyawanya menggunakan pereaksi warna. Fraksi diamati perubahan warna sebelum dan setelah penambahan pereaksi warna. Hasilnya menunjukkan bahwa fraksi B mengandung golongan senyawa terpenoid (perubahan warna dari hijau menjadi kuning), alkaloid (terdapat pengendapan setelah penambahan dragendorf), dan Fenolik (perubahan dari hijau menjadi kuning). Hal ini dapat dilihat pada tabel 3.

Daun laruna yang berbau khas karena memiliki kandungan minyak atsiri. Komponen utama dari minyak atsiri daun adalah α -pinene (42.2%), β -pinene (10.6%), germacrene D (9.7%), β -copaen-4 α -ol (9.4%), (E)-caryophyllene (5.4%), and geijerene/pregeijerene (7.5%) (Owolabi, et al., 2010). Ekstrak metanol dari daun Botto-botto mengandung alkaloid, sedangkan ekstrak airnya mengandung fenolik, terpenoid (Akinmoladun, Ibukun, & Dan-Ologe, 2007).

Kandungan α -pinene ini memiliki aktivitas anti kanker dengan menaikkan kadar Chk1 dan Chk2 dan menurunkan kadar *Cyclin B*,

CDC25 dan CDK1 (Chen, et al., 2015). Beberapa alkaloid yang diisolasi dari tumbuhan memiliki sifat antiproliferasi seperti berberine, evodiamine, matrine, piperine, sanguinarine, dan tetrandrine, juga dapat dikembangkan menjadi obat antikanker (Lu, Bao, Chen, Huang, & Wang, 2012).

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi B dari ekstrak metanol paling selektif dalam menghambat sel kanker HeLa dengan nilai selektifitasnya sebesar 3,39. Hal ini menunjukkan fraksi B berpotensi dikembangkan sebagai agen kemoterapi dalam meningkatkan efektivitas pada pengobatan kanker leher rahim.

DAFTAR PUSTAKA

- Adedapo, A. A., Oyagbemi, A. A., & Yakubu, M. A. (2016). Evaluation of Anticancer Properties of The Methanol Leaf Extract of *Chromolaena odorata* on Ht-29 Cell Line. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 30(S1), 53-57.
- Akinmoladun, A. C., Ibukun, E., & Dan-Ologe, I. (2007). Phytochemical constituents and antioxidant properties of extracts from the leaves of *Chromolaena odorata*. *Scientific Research and Essay*, 2(6), 191-194.

- Andrijono. (2007). *Kanker Serviks. Edisi I*. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424.
- Bruni, L., Albero, G., Serrano, B., Mena, M., Gómez, D., Muñoz, J., . . . Centre, & I. (2019). *Human Papillomavirus and Related Diseases Report*. ICO/IARC HPV Information Centre.
- Chen, W., Liu, Y., Li, M., Mao, J., Zhang, L., Huang, R., . . . Ye, L. (2015). Anti-tumor effect of α -pinene on human hepatoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest. *Journal of Pharmacological Sciences*, 127(3), 332-328.
- Doyle, A., & Griffiths, J. B. (2000). *Cell and Tissue Culture for Medical Research*. New York: John Willey and Sons.
- Fitrah, M. (2016). Identifikasi Ekstrak Daun Kopasanda (*Chromolaena Odorata* Linn) Terhadap Sel Antiproliferasi Tikus Leukemia L1210. *Jurnal Farmasi UIN Alauddin Makassar*, 4(3).
- Freshney, R. I. (1986). *Animal Cell Culture, A Practical Approach*,. (1. Ed, Ed.) Washington D.C.: IRL Press.
- Kouamé, P. B.-K., Jacques, C., Bedi, G., Silvestre, V., Loquet, D., Barillé-Nion, S., . . . Tea, I. (2013). Phytochemicals isolated from leaves of *Chromolaena odorata*: impact on viability and clonogenicity of cancer cell lines. *Phytotherapy Research*, 835-840.
- Lu, J.-J., Bao, J.-L., Chen, X.-P., Huang, M., & Wang, Y.-T. (2012). Alkaloids Isolated from Natural Herbs as the Anticancer Agents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Marks, D. B., & Mark, A. D. (2000). *"Biokimia Kedokteran Dasar: Sebuah Pendekatan Klinis"*. Jakarta: EGC. Jakarta: EGC.
- Mukhriani, Edy, A. A., Ilyas, M. F., & Leboe, D. W. (2016). Analisis Efektivitas Daun Botto-botto (*Chromolaena Odorata* L) Terhadap *Artemia Salina* Leach Yang Berpotensi Sebagai Agen Antikanker. *Jurnal Farmasi UIN Alauddin Makassar*, 4(1).
- Owolabi, M. S., Ogundajo, A., Yusuf, K. O., Lajide, L., Villanueva, H. E., J. A., & Setzer, W. N. (2010). Chemical composition and bioactivity of the essential oil of *Chromolaena odorata* from Nigeria. *Records of Natural Products*, 4(1), 72-78.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Ahmedin Jemal, D. (2017). *Cancer Statistics, 2017*. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67, 7-30.
- Tia, L. J., Lui, A. G., Chua, N. S., & Strebel, H. M. (2015). Chemotherapy-induced neutropenia, anemia and thrombocytopenia among Filipino breast cancer patients on adjuvant chemotherapy. *Acta Medica Phillipina*, 49(2).
- Yu, J. (2013). Intestinal stem cell injury and protection during cancer therapy. *Translational cancer research*, 2(5), 384-396.