

**UJI SITOTOKSIK EKSTRAK N-HEKSAN DAUN BOTTO'-BOTTO' (*Chromolaena odorata* L.)
TERHADAP CELL LINE KANKER KOLON WiDr**

Dwi Wahyuni Leboe, Surya Ningsi, Anitsah Fiqardina

Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Alauddin Makassar,
JL. Sultan Alauddin No. 36, Samata, Gowa
Email: dwiwahyunileboe@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksik ekstrak n-heksan daun botto'-botto' pada cell line kanker kolon WiDr secara *in vitro* dan mengetahui berapa besar nilai IC₅₀ dari ekstrak tanaman tersebut. Uji aktivitas sitotoksik ekstrak n-heksan daun botto'-botto' dilakukan dengan memberikan 5 seri konsentrasi bahan uji yaitu 1000 µg/ml; 500 µg/ml; 250 µg/ml; 125 µg/ml dan 62,5 µg/ml; pada sel kanker kolon WiDr yang kemudian diinkubasikan selama 24 jam. Penghitungan sel dilakukan setelah pemberian MTT dan SDS stopper. *Persentase inhibisi* yang dihasilkan dari masing-masing konsentrasi sampel uji secara berturut-turut adalah 97,9 %; 98,3%; 69,6%; 21,3%; dan 14,5%. Ekstrak n-heksan daun botto'-botto' mempunyai nilai IC₅₀ sebesar 162,18 µg/ml. Hasil ini tidak memenuhi kriteria yang ditetapkan NCI *National Cancer Institute* sebagai antikanker yaitu dengan range <30 µg/ml. Analisis korelasi-regresi pada grafik menunjukkan hasil yang tidak linear untuk 5 seri konsentrasi sampel uji yang digunakan. Sehingga dapat disimpulkan ekstrak n-heksan daun botto'-botto' (*Chromolaena odorata* L.) tidak bersifat sitotoksik terhadap cell line kanker kolon WiDr.

Kata kunci : Sitotoksik, Kanker Kolon, Sel WiDr, *Chromolaena odorata* L.

Pendahuluan

Penyakit kanker merupakan salah satu penyebab kematian utama di seluruh dunia. Pada tahun 2012, kanker menjadi penyebab kematian sekitar 8,2 juta orang. Berdasarkan data GLOBOCAN, *International Agency for Research on Cancer* (IARC) diketahui bahwa pada tahun 2012 terdapat 14.067.894 kasus baru kanker dan 8.201.575 kematian akibat kanker di seluruh dunia. Penyebab terbesar kematian akibat kanker setiap tahunnya salah satunya disebabkan oleh kanker kolorektal (Kemenkes, 2015).

Kanker kolorektal merupakan salah satu jenis kanker yang terjadi pada mukosa kolon dimana penyakit ini mempunyai angka morbiditas dan mortalitas yang tinggi. Berdasarkan studi epidemiologi yang dilakukan oleh Haggard, et al tahun 2009 dikatakan bahwa jumlah insiden kanker kolorektal di dunia mencapai 9% dari semua jenis kanker. Berdasarkan data dari *World Cancer Research Fund International* (WCRF) tahun 2008 kanker kolorektal menempati peringkat ketiga setelah kanker paru dan kanker payudara sebagai kanker dengan frekuensi terbanyak dengan 1,2 juta kasus baru. Data *World Health Organization* (WHO) tahun 2008 menempatkan kanker kolorektal pada urutan keempat setelah kanker paru, kanker lambung dan kanker hati sebagai penyebab kematian akibat kanker dengan 608.000 kematian. Berdasarkan jenis kelamin penderitanya di seluruh dunia, kanker kolorektal menempati posisi kedua umum terjadi pada pria (746.000 kasus atau sebesar 10 %) dan posisi ketiga pada wanita (614.000 kasus atau 9,2%) (Globocan, 2012).

Di Indonesia sudah mulai banyak data mengenai angka kejadian kanker kolorektal. Menurut Profil Kesehatan Indonesia tahun 2008, kanker kolorektal di Indonesia berada pada peringkat 9 dari 10 peringkat utama penyakit kanker pasien rawat inap di seluruh rumah sakit di Indonesia dengan jumlah kasus sebanyak 1.810 dengan proporsi sebesar 4,92%. Berdasarkan data Rumah Sakit Kanker Dharmas tahun 2010, kanker kolorektal masuk dalam 10 besar kanker tersering dimana kanker rektum menempati urutan keenam dan kanker kolon menempati urutan kedelapan. (Tatuhey dkk, 2012).

Masalah kanker umumnya dapat ditangani berdasarkan pada upaya pengangkatan jaringan kanker atau dengan mematikan sel kanker tersebut serta meminimalkan efek yang tidak diinginkan

terhadap sel-sel normal. Hal ini harus diimbangi dengan pemberian obat-obatan berupa kemoterapi atau penyinaran dengan sinar X untuk mengatasi kemungkinan sel telah mengalami metastasi dan untuk menghambat proliferasi sel kanker yang mungkin masih tertinggal dan perlu terus dikembangkan usaha pengembangan obat yang aman dan efektif, salah satunya melalui eksplorasi alam.

Indonesia merupakan negara kedua setelah Brazil yang memiliki keanekaragaman genetik cukup banyak. Para ilmuwan telah banyak menggali dan mengeksplorasi kekayaan alam untuk mencari peluang dalam mengembangkan obat-obatan baru (Hermani, 2006). Namun demikian, sampai sejauh ini baik mengenai kandungan kimia, khasiat maupun efek sampingnya (tanaman/obat herbal) belum banyak dilaporkan atau diteliti secara ilmiah. Salah satu tumbuhan yang biasa digunakan masyarakat sebagai bahan obat adalah daun Botto'-botto' atau biasa disebut dengan nama Kirinyu (Sunda), tumbuhan ini oleh masyarakat hanya digunakan sebagai obat luka dan secara luas juga dikenal sebagai gulma padang rumput dan perkebunan.

Botto'-Botto', *Chromolaena odorata* (L) (Asteraceae: Asterales) dalam bahasa Inggris disebut *siam weed* merupakan gulma padang rumput yang sangat luas penyebarannya di Indonesia. Gulma ini diperkirakan sudah tersebar di Indonesia sejak tahun 1910-an (Sipayung et al., 1991), dan tidak hanya terdapat di lahan kering atau pegunungan tetapi juga banyak terdapat di lahan rawa dan lahan basah lainnya (Thamrin dan Asikin, 2013).

Studi pendahuluan telah dilakukan dengan tujuan untuk menskrining senyawa toksik dari sampel ekstrak daun botto'-botto' dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dengan LC₅₀ ekstrak n-Heksan 10,91 µg/ml (Habritasari, 2014). Hasil dalam penelitian lain dilaporkan bahwa ekstrak n-heksan daun botto'-botto' berefek antimitosis pada sel telur bulubabi (*Tripneustus gratilla* Linn) dengan nilai IC₅₀ yaitu 11,85 µg/ml (Pratiwi, 2014). Selain itu penelitian yang dilakukan Suriyavathana M et al., tahun 2012 membuktikan adanya kandungan dari ekstrak daun botto'-botto' yang memberikan efek antioksidan seperti kita ketahui bahwa antioksidan dapat menangkal radikal bebas. Senyawa radikal bebas merupakan salah satu faktor penyebab kerusakan DNA di samping penyebab lain seperti virus. Bila kerusakan tidak terlalu parah, masih dapat diperbaiki oleh sistem perbaikan

DNA. Namun, bila sudah menyebabkan rantai DNA terputus di berbagai tempat, kerusakan ini tidak dapat diperbaiki lagi sehingga pembelahan sel akan terganggu. Bahkan terjadi perubahan abnormal yang mengenai gen tertentu dalam tubuh yang dapat menimbulkan penyakit kanker (Suryo, 2008).

Penelitian ini menguji aktivitas antikanker ekstrak daun botto'-botto' terhadap sel kanker kolon WiDr. Sel WiDr dipilih karena memiliki kelebihan yaitu mudah dikulturkan dan memiliki *doubling time* yang singkat bila dibandingkan dengan kultur sel kanker lainnya. Sel ini juga memiliki *plating efficiency* yang tinggi. (Noguchi et al., 1979).

Untuk menambah data ilmiah mengenai manfaat daun botto'-botto', utamanya dalam menemukan obat kanker alternatif, maka perlu dilakukan penelitian mengenai uji aktivitas ekstrak n-heksan daun botto'-botto' terhadap penghambatan sel WiDr.

Metode Penelitian

Jenis Penelitian: Penelitian ini menggunakan analisis eksperimental untuk uji toksisitas senyawa aktif dari bahan alam untuk mencari obat baru secara *in vitro*.

1. Pengolahan Sampel

Sampel yang digunakan adalah daun botto'-botto' yang segar, dicuci bersih dengan air mengalir kemudian dipotong-potong kecil dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan, tidak terkena paparan sinar matahari langsung. Kemudian dilakukan ekstraksi berupa maserasi.

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu secara maserasi. Dimana maserasi merupakan metode yang paling mudah dilakukan dan menggunakan peralatan yang sederhana, yaitu dengan cara merendam sampel dalam cairan penyari. Cairan penyari yang digunakan adalah n-heksan.

Sampel daun botto'-botto' yang sebelumnya telah dikeringkan, ditimbang sebanyak 300 gram dimasukkan dalam wadah maserasi, kemudian ditambahkan dengan cairan penyari pertama yaitu n-heksan hingga semua sampel terendam keseluruhan dan ditutup rapat. Dibiarkan selama 2 kali 24 jam sambil diaduk sekali-kali. Disaring dan dipisahkan filtratnya.. Ekstrak n-heksan yang diperoleh dipisahkan dengan alat *rotary evaporator*, didapatkan ekstrak kental n-heksan.

2. Pembuatan Media Kultur

Dilarturkan bubuk RPMI ke dalam 800 ml akuades, kemudian ditambahkan 2 gram 4-(2-hydroxyethyl)-1 piperazineethanesulfonic acid (HEPES) dan 2 gram NaHCO₃. Ditambahkan

akuades sampai volume 1 L. Campuran dihomogenkan dengan cara diaduk kemudian pH diukur pada 7,2-7,4 dengan cara penambahan 1M NaOH atau 1M HCl. Sterilisasi dilakukan dengan cara menyaring menggunakan saringan membran 0,2 µm, selanjutnya ditambahkan fungsi 0,5%, *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%, dan streptomisin 1%. Ditampung ke dalam botol duran.

3. Penanaman Sel

Mula-mula dilakukan panen sel. Diambil sel dari tangki nitrogen cair, amati kondisi sel. Panen sel dilakukan setelah sel 80% konfluen. Dibuang media dengan menggunakan mikropipet. Dicuci sel sebanyak 2 kali dengan PBS (volume PBS adalah ±½ volume media awal). Ditambahkan tripsin-EDTA (tripsin 0,25%) secara merata dan diinkubasi di dalam inkubator selama 3 menit. Ditambahkan media ± 5 ml untuk menginaktifkan tripsin. Diamati keadaan sel di mikroskop. Dittransfer sel yang telah lepas satu-satu ke dalam conical steril baru. Resuspensi sel di *conical tube* dari hasil panen. Diambil 10 µl panen sel dan dipipetkan ke *haemocytometer*. Dihitung sel di bawah mikroskop *inverted* dengan bantuan counter. Dilakukan transfer sejumlah sel yang diperlukan ke dalam *conical* lain dan ditambahkan media komplit sesuai konsentrasi yang dibutuhkan. Jika sudah siap, dittransfer sel ke dalam sumuran, masing-masing 100 µl. Sisakan 4 sumuran kosong untuk kontrol media. Diamati keadaan sel di mikroskop *inverted* untuk melihat distribusi sel dan didokumentasikan. Diinkubasi 24 jam.

4. Preparasi Sampel dan Treatment

Larutan Uji dibuat dengan melarturkan 10 mg ekstrak n-heksan botto' botto' dalam 100 µl DMSO sehingga diperoleh stok 1000 ppm. Dari larutan stok dibuat seri konsentrasi 1000 µg/ml; 500 µg/ml; 250 µg/ml; 125 µg/ml; dan 62,5 µg/ml dalam media kultur RPMI untuk uji sitotoksik. Pekerjaan ini dilakukan di LAF. Diambil plate dari inkubator CO₂ untuk dibawa ke LAF. Dibuang media sel (balikkan *plate* 180°) di atas tempat buangan dengan jarak 10 cm, kemudian tekan *plate* secara perlahan di atas tisu untuk meniriskan sisa cairan. Dimasukkan seri konsentrasi sampel ke dalam sumuran (triplo). Inkubasi di dalam inkubator CO₂ selama 24 jam.

5. Uji Sitotoksik MTT

Menjelang waktu akhir inkubasi, dokumentasikan kondisi sel untuk setiap perlakuan (foto dahulu). Buang media sel, tambahkan reagen MTT 100 µl ke setiap sumuran, termasuk kontrol media (tanpa sel).

Inkubasi sel selama 2-4 jam di dalam inkubator (sampai terbentuk formazan). Periksa kondisi sel dengan mikroskop inverted. Jika formazan telah jelas terbentuk, tambahkan *stopper* SDS 10% dalam 0,1 N HCl. Pekerjaan tidak perlu dilakukan di dalam LAF hood. Bungkus *plate* dengan kertas atau aluminium foil dan inkubasikan di tempat gelap (suhu ruangan) semalam. Selanjutnya pembacaan absorbansi, hidupkan *ELISA reader*, tunggu proses progressing hingga selesai. Buka pembungkus *plate* dan tutup *plate*. Masukkan ke dalam *ELISA reader*. Baca absorbansi masing-masing sumuran dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 595 nm tekan tombol *START*. Matikan *ELISA reader*. Simpan dan tempel kertas hasil *ELISA* pada LOG BOOK.

Hasil dan Pembahasan

Tabel 1. Hasil Ekstraksi Daun Botto'-Botto'

Berat Sampel	Berat Ekstrak	% Rendemen
300 g	500 mg	0.16 %

Tabel 2. Uji Sitotoksik WiDr

Konsentrasi	Log Konsentrasi	% Inhibisi	Nilai Probit
1000	3	97,9	7,0335
500	2,6989	98,3	7,1204
250	2,3979	69,6	5,5129
125	2,0969	21,3	4,2039
62,5	1,7958	14,5	3,9419

Sejumlah 300 gram simplisia daun botto'-botto' diekstraksi menggunakan metode maserasi menggunakan pelarut n-heksan sebanyak 4 liter (dilakukan dua kali), menghasilkan ekstrak kental daun botto'-botto' sebanyak 500 mg. Jumlah persentase rendemen yang diperoleh dari ekstrak n-heksan daun botto'-botto' adalah 0,16 %.

Hasil yang didapatkan pada pengujian menggunakan kultur sel WiDr untuk ekstrak n-heksan daun botto'-botto' dengan konsentrasi 1000 µg/ml; 500 µg/ml; 250 µg/ml; 125 µg/ml dan 62,5 µg/ml dengan nilai persentase inhibisi berturut-turut sebagai berikut 97,9%; 98,3 %; 69,6 %; 21,3 % dan 14,5 %. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi dari sampel uji yang diberikan maka semakin kecil persentase kehidupan sel kanker dan semakin besar sifat toksisitasnya.

Berdasarkan pengolahan data yang telah dilakukan dengan metode analisis probit diperoleh nilai IC₅₀ untuk sel WiDr dari pengujian menggunakan ekstrak n-heksan daun botto'-botto' adalah 162,18 µg/ml µg/ml. Penetapan

batas toksik penelitian ini menggunakan kriteria *National Cancer Institute* (NCI). Kriteria ini menyebutkan suatu ekstrak dinyatakan aktif memiliki aktivitas antikanker apabila memiliki nilai IC₅₀ < 30 µg/ml, moderate aktif apabila memiliki nilai IC₅₀ ≥ 30 µg/ml dan IC₅₀ < 100 µg/ml dan dikatakan tidak aktif apabila nilai IC₅₀ > 100 µg/ml. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak n-heksan daun botto'-botto' tidak aktif terhadap *cell line* kanker kolon WiDr karena nilai IC₅₀ yang diperoleh lebih dari 100 µg/ml. Oleh karena itu penelitian ini akan lebih baik bila dilanjutkan pengujiannya dengan mengisolasi senyawa murni yang terkandung dalam ekstrak daun botto'-botto' yang mampu memberikan reaksi aktif terhadap *cell line* kanker dengan hasil yang memenuhi kriteria.

Kesimpulan

1. Ekstrak n-heksan daun botto'-botto' tidak memiliki aktivitas sitotoksik terhadap *cell line* kanker kolon WiDr.
2. Nilai IC₅₀ ekstrak n-heksan daun botto'-botto' adalah 162,18 µg/ml. Hasil IC₅₀ yang diperoleh > 100 µg/ml sehingga disimpulkan tidak aktif sebagai antikanker.

Kepustakaan

- Habritasari, Annisa. *Skrining Uji Toksisitas Ekstrak Etanol dan Ekstrak N-Heksan Daun Botto'-Botto' (Chromolaena Odorata) Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test*. Skripsi Sarjana, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar. 2014
- Haggar FA and Boushey RP. *Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival and Risk Factors*. Thieme Medical Publisher. 2009.
- Hermani dan Raharjo, M. *Tanaman Berkhasiat Antioksidan*, Penebar Swadaya. Jakarta. 2006
- Kementerian Kesehatan RI. *Buletin induk data dan informasi kesehatan : situasi penyaki kanker*. Jakarta. 2015
- Noguchi, P., Wallace, J.J., Early, M.E., O'Brien S., Ferrone, S., Pellegrino, A.M., at al. *Characterization of WiDr : A Human*

Colon Carcinoma Cell Line, In Vitro.
1979

Pratiwi. *Skrining Uji Efek Antimitosis Ekstrak Daun Botto'-Botto' (Chromolaena odorata L.) Menggunakan Sel Telur Bulubabi (Tripneustus gratilla L.).* Skripsi Sarjana, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar. 2014

Sipayung, A., R.D. De Chenon and P.S. Sudharto. *Observations on Chromolaena odorata (L.) R.M. King and H. Rubinson in Indonesia. Second international Wokshop on the Biological Control and Management of Chromolaena odorata.* Biotrop, Bogor. 1991.

Suriyavathana M et Al. *In-Vitro Antioxidant Activity of Chromolaena Odorata (L.) King and Robinson.* Department of Biochemistry, Periyar University. India. 2012

Suryo. *Genetika Manusia.* Yogyakarta: Gadjah Mada University Press. 2008.

Tatuhey, W.S., Nikijuluw, H., Mainase, J., *Karakteristik Kanker Kolorektal Di RSUD Dr. M Haulussy Ambon Periode Januari 2012-Juni 2013.* Molucca Medica: Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Volume 4. 2014

Thamrin, M., Asikin S., dan Willis M. *Tumbuhan Kirinyu Chromolaena odorata (L) (Asteraceae: Asterales) Sebagai Insektisida Nabati Untuk Mengendalikan Ulat Grayak Spodoptera litura.* Balai Penelitian Pertanian Lahan Rawa. Kalimantan Selatan. 2013