

AKTIVITAS SITOTOKSISITAS EKSTRAK ETANOL KULIT BUAH JAMBU MENTE (*Anacardium occidentale* L.) TERHADAP SEL MIELOMA

Ermelinda Dheta Meye
Jurusan Biologi, FST, UNDANA

ABSTRACT

The activity of cashew nut shell liquid as one of the anticancer agent, especially at myeloma cell has been carried out. The main purpose of this research is to determine the cytotoxicity of cashew nut shell ethanol extract to myeloma cell.

Myeloma cells were divided into treatment groups, control cell group, positive control group, medium control group and cosolven control, each of 3 repeats. The concentration of cashew nut shell ethanol extract which is used 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 µg/mL and doxorubicin 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL. Cytotoxicity test use direct counting method. The result of this research showed that $LC_{50} = 40.514$ µg/mL at cytotoxicity test with direct counting method. The result of this research could be concluded that cashew nut shell (*Anacardium occidentale* L.) ethanol extract has toxic activity to myeloma cells.

Keywords: *Cytotoxicity, cashew, myeloma cell, direct counting.*

Kanker menjadi penyebab kematian ketiga di Indonesia setelah jantung dan stroke. Salah satu tipe kanker adalah *multiple myeloma*. *Multiple myeloma* merupakan kanker darah kedua yang paling umum setelah leukemia yaitu kira-kira 2 % dari seluruh kematian yang disebabkan oleh kanker [Mader, 2006]. Berbagai usaha penyembuhan terhadap penyakit *multiple myeloma* telah dilakukan, antara lain dengan kemoterapi dan terapi radiasi. Namun, pengobatan dengan cara tersebut membutuhkan biaya yang sangat mahal dan juga menimbulkan efek samping yang tidak diinginkan. Oleh karena itu, saat ini telah banyak dilakukan penelitian untuk mendapatkan alternatif pengobatan kanker dengan memanfaatkan bahan alam (*natural product*). Salah satu bahan alam yang berpotensi sebagai obat kanker adalah jambu mente (*Anacardium occidentale* L.).

Buah semu dan buah jambu mente mengandung vitamin C, karotenoid, mineral dan komponen fenol. Komponen fenol mempunyai potensi sebagai antioksidan, antimutagenik, antibakteri, antifungi, anti moluskasida dan antitumor [Cavalcante *et al.*, 2005; Kubo *et al.*, 1986; 1993a; 1993b; Trevisan *et al.*, 2006].

Menurut penelitian Ola *et al.*, (2008), cairan kulit buah jambu mente asal pulau Timor NTT mempunyai aktivitas sitotoksitas terhadap sel HeLa, di mana pada konsentrasi 0,0312 mg/mL dapat menyebabkan kematian sel HeLa sebesar 65,73 %.

Aktivitas sitotoksisitas juga ditunjukkan asam anakardat dan kardanol yang diisolasi dari cairan kulit buah jambu mente. Kematian sel HeLa oleh asam anakardat dimulai pada konsentrasi 0,500 mg/mL yaitu sebesar 11,7% sedangkan kardanol 6,93 % pada dosis 0,13 mg/mL.

Berdasarkan penelitian Kubo *et al.*, (1993b) menunjukkan bahwa komponen fenol yang terdapat di dalam cairan kulit buah jambu mente bersifat selektif terhadap berbagai sel kanker. Oleh karena itu, dalam penelitian ini digunakan sel mieloma untuk mengetahui apakah komponen fenol tersebut juga mempunyai aktivitas sitotoksisitas terhadap sel mieloma.

Sel mieloma merupakan sel kanker darah dan mempunyai morfologi seperti sel plasma darah. Pertama kali sel mieloma (*myeloma cell line*) diisolasi dari mencit Balb/c [Anonim, 1983]. Sel ini diadaptasikan ke dalam kultur secara terus menerus dan dapat tumbuh dalam medium RPMI 1640 yang mengandung *Fetal Bovine Serum* 10 %, fungizon 0,5 % dan antibiotik penisilin-streptomisin 1 % pada suhu 37⁰C.

Walaupun mempunyai aktivitas biologis yang cukup tinggi, namun kulit buah jambu mente belum dimanfaatkan secara maksimal dan sementara ini hanya menjadi sampah setelah buahnya diambil. Selain itu, penelitian yang berkaitan dengan kulit buah jambu mente masih jarang dilakukan di Indonesia. Oleh karena itu, dalam rangka mengetahui kebenaran ilmiah tentang khasiat kulit buah jambu mente, maka telah dilakukan penelitian tentang aktivitas cairan kulit buah jambu mente sebagai salah satu senyawa antikanker, khususnya pada sel mieloma. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas sitotoksisitas ekstrak etanol kulit buah jambu mente terhadap sel mieloma.

MATERI DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan untuk uji sitotoksisitas adalah kulit buah jambu mente diperoleh dari desa Tilong kabupaten Kupang propinsi NTT yang diekstraksi dengan metode soxhletasi dan menggunakan pelarut etanol 95 %. Sel mieloma diperoleh dari laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM Yogyakarta, Dimetil Sulfoksida (DMSO) 10%, medium RPMI (*Rosewell Park Memorial Institute*) 1640 (Sigma), medium kultur (penumbuh) RPMI 1640 yang mengandung Fetal Bovin Serum (FBS) 10% (Gibco), fungizon 0,5 % (v/v) (Gibco) dan antibiotik Penisilin-Streptomisin 1% (v/v) (Gibco), *phosphate buffered saline* (PBS) 20 % (Sigma), *trypan blue* 5 % (0,5 g *trypan blue* dalam 100 mL aquades) dan doxorubicin (Gibco) sebagai kontrol positif.

Alat

Alat yang digunakan adalah ekstraktor soxhlet, *rotary evaporato*, *autoclave*, cawan porselin, inkubator CO₂ (Heraeus), tangki nitrogen cair, tabung *conical* steril (Nunclone), sentrifuge Sigma 3K12 (B. Braun Biotech International), timbangan analitik (AND GF-2000), timbangan elektrik kapasitas 1200g (Shimadzu), lemari pendingin, vorteks (Genie), *laminar air flow cabinet* (Nuair), *tissue culture flask* (Iwaki), mikropipet (Nichipet ex), *blue tip*, *yellow tip*, *cell counter*, *haemocytometer* (Nebauer), *96-well plate* (Iwaki), tabung *ependorf*, mikroskop cahaya (Olympus) dan kamera digital (Canon).

Uji sitotoksitas dengan metode *Direct Counting*

Suspensi sel mieloma sebanyak 100 µl dengan kepadatan 3×10^4 sel/100 µl media didistribusikan ke dalam sumuran-sumuran pada *96-well plate* dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah diinkubasi, ke dalam sumuran dimasukkan 100 µl larutan uji dan 100 µl doxorubicin sebagai kontrol positif pada berbagai seri konsentrasi. Sebagai kontrol sel ditambahkan 100 µl medium kultur dan kontrol pelarut ditambahkan 100 µl DMSO, kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator dengan aliran 5 % CO₂ dan 95 % O₂. Pada akhir inkubasi pada masing-masing sumuran ditambahkan 50 µl *trypan blue* 0,5 %, diresuspensi dengan mikropipet sampai sel-sel yang melekat di dasar sumuran terlepas, kemudian diambil 10 µl suspensi sel tersebut, dimasukkan ke bilik *haemocytometer* dan jumlah sel dihitung langsung di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 100 x [Dhiani *et al.*, 2006].

Analisis Data

Jumlah sel mieloma yang dihitung dengan metode *Direct Counting* dikonversikan dalam % kematian sel. Persentase kematian sel diubah ke dalam nilai probit, kemudian dibuat hubungan antara log konsentrasi (X) dan nilai probit (Y) sehingga diperoleh persamaan regresi linier untuk menghitung harga LC₅₀ dengan menggunakan analisa probit [Cassaret & Doull, 1971].

Data kuantitatif dianalisis dengan ANOVA satu arah untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan. Jika terdapat perbedaan yang nyata, dilanjutkan dengan uji *Least Significant Difference* (LSD). Kedua uji tersebut dilakukan pada taraf kepercayaan 95 % dengan menggunakan program SPSS 13.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sitotoksitas ekstrak etanol kulit buah jambu mente terhadap sel mieloma

Aktivitas antikanker kulit buah jambu mente terhadap sel mieloma dapat dideteksi dengan melakukan uji sitotoksitas. Metode uji sitotoksitas yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode *Direct Counting*. Perhitungan jumlah sel dengan metode *Direct Counting* berdasarkan kenampakan morfologi sel di bawah mikroskop cahaya dengan penambahan sejumlah zat pewarna, seperti *trypan blue*.

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa *trypan blue* hanya akan memasuki membran sel yang rusak (sel mati), sehingga sel mati akan mengembang dan berwarna biru tua. Integritas membran sel mati menurun sehingga tidak permeabel lagi terhadap berbagai senyawa yang masuk. Sel hidup (viabel) tetap berukuran normal, bulat, berpendar dan tidak berwarna biru (Gambar 1). Jarak antara pewarnaan dengan perhitungan sel dilakukan tidak kurang dari 3 menit dan maksimal selama 10 menit. Jika terlalu lama maka sel yang hidup juga akan berwarna biru sehingga hasilnya menjadi positif palsu [Freshney, 1987].



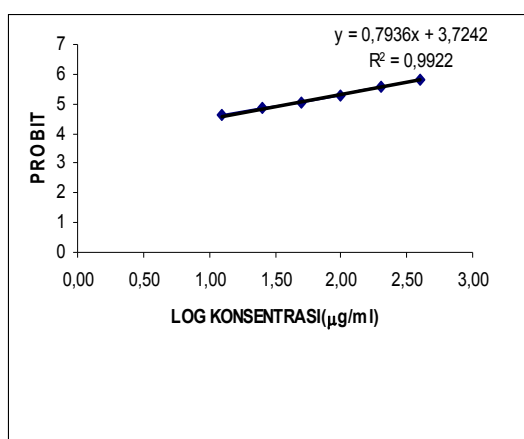
Gambar 1. Morfologi sel mieloma dengan pewarnaan *trypan blue*; (a) sel hidup; (b) sel mati; (bars = 100 μ m)

Tabel 1. Persentase kematian sel mieloma dengan perlakuan ekstrak kulit buah jambu mente

Konsentrasi(μ g/mL)	% Kematian Sel
400	79,57 ^a
200	71,27 ^b
100	60,22 ^c
50	51,11 ^d
25	43,56 ^e
12,5	35,84 ^e
0	0 ^f

Angka yang diikuti dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata ($\alpha=0,05$)

Berdasarkan hasil uji sitotoksisitas ekstrak etanol kulit buah jambu mente pada penelitian ini menunjukkan hasil yang signifikan. Hasil uji LSD ($\alpha=0,05$) pada uji sitotoksisitas tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan perlakuan (Tabel 1). Berdasarkan Tabel 1, terlihat bahwa persentase kematian sel mieloma terus meningkat sebanding dengan kenaikan konsentrasi ekstrak yang dimulai pada konsentrasi 12,5 $\mu\text{g/mL}$ yaitu sebesar 35,84 %. Kematian sel terbesar pada konsentrasi 400 $\mu\text{g/mL}$ yaitu sebesar 79,57 %. Fenomena ini menunjukkan bahwa ekstrak kulit buah jambu mente bersifat toksik terhadap sel mieloma.



Gambar 2. Hasil uji sitotoksisitas ekstrak etanol kulit buah jambu mente.

Persentase kematian sel mieloma kemudian dikonversikan ke dalam tabel probit dan dibuat grafik regresi linier sehingga dapat dihitung LC_{50} berdasarkan persamaan yang diperoleh dengan menggunakan analisis probit [Cassaret & Doull, 1971]. LC_{50} digunakan sebagai parameter untuk mengevaluasi potensi sitotoksisitas sampel uji terhadap sel mieloma.

Grafik yang terbentuk linier menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak, maka semakin besar juga persentase kematian sel mieloma (Gambar 2). Berdasarkan grafik regresi linier tersebut, nilai LC_{50} pada uji sitotoksisitas tersebut adalah 40,514 $\mu\text{g/mL}$. Aktivitas penghambatan pertumbuhan sel mieloma dengan perlakuan ekstrak etanol kulit buah jambu mente termasuk *dose dependent* (tergantung dosis).

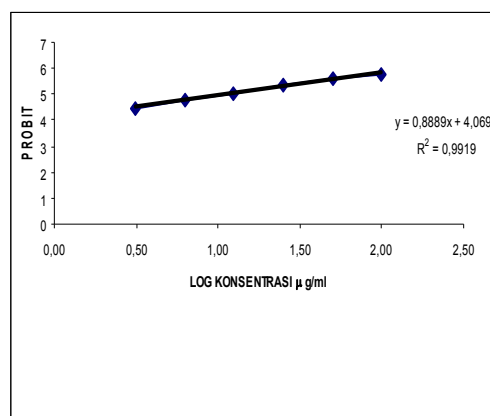
Tabel 2. Persentase kematian sel mieloma dengan perlakuan doxorubicin

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	% Kematian Sel
100	78,49 ^a
50	73,33 ^a
25	64,44 ^a
12,5	50,55 ^b
6,25	41,83 ^c
3,125	30,30 ^d
0	0 ^e

Angka yang diikuti dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata ($\alpha=0,05$)

Sebagai kontrol positif digunakan doxorubicin. Doxorubicin merupakan salah satu obat kanker yang telah digunakan di dunia medis untuk pengobatan kanker. Penggunaan kontrol positif bertujuan untuk mengevaluasi keberhasilan uji sitotoksitas sebagai bukti terjadinya efek sitotoksik. Pada Tabel 2 tersebut di atas menunjukkan bahwa doxorubicin dapat menyebabkan kematian sel mieloma yang dimulai pada konsentrasi 3,125 $\mu\text{g/mL}$ dengan persentase kematian sebesar 30,30 %. Persentase kematian sel mieloma meningkat terus sampai dengan konsentrasi tertinggi yaitu 100 $\mu\text{g/mL}$ sebesar 78,49 %. Hasil uji ANAVA ($\alpha=0,05$) adalah signifikan, tetapi hasil uji LSD menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan nyata antara konsentrasi 100, 50 dan 25 $\mu\text{g/mL}$. Namun, hasil uji LSD menunjukkan hasil yang signifikan antara kelompok perlakuan dengan kontrol .

Aksi sitotoksik doxorubicin antara lain dengan mengikat DNA dan menghambat sintesis DNA maupun RNA. Selain itu juga menghambat aktivitas enzim topoisomerase II dengan cara membentuk kompleks dengan DNA [Govaze *et al.*, 2001; Rang *et al.*, 2003].



Gambar 3. Hasil uji sitotoksitas terhadap sel mieloma dengan perlakuan doxorubicin.

Berdasarkan grafik regresi linier pada Gambar 3 menunjukkan bahwa nilai LC_{50} sebesar 11,149 $\mu\text{g/mL}$. Nilai LC_{50} dengan perlakuan doxorubicin ini lebih kecil daripada

nilai LC₅₀ dengan perlakuan ekstrak etanol kulit buah jambu mente yaitu. 40,514 µg/mL. Walaupun demikian, nilai LC₅₀ tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit buah jambu mente juga bersifat toksik terhadap sel mieloma dan berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat kanker. Hal ini sesuai dengan pendapat Meyer *et al.*, (1982) yang mengatakan bahwa suatu senyawa bersifat sitotoksik jika mempunyai LC₅₀ lebih kecil dari 1000 µg/mL. Semakin kecil nilai LC₅₀, tingkat ketoksikan suatu senyawa semakin besar.

Menurut Ola *et al.*, (2008), senyawa yang berperan sebagai agen antikanker yang telah diisolasi dari cairan kulit buah jambu mente asal pulau Timor adalah kardanol sebagai komponen utama, asam anakardat dan kardol sebagai komponen minor. Komponen kimiawi yang terkandung di dalam ekstrak etanol kulit buah jambu mente asal pulau Timor diduga dapat meningkatkan ekspresi gen p53 sehingga dapat memacu *cell cycle arrest* atau apoptosis. Apoptosis merupakan salah satu strategi yang sangat efisien untuk kemoterapi kanker.

Komponen fenol (asam nakaradat, kardol dan kardanol) yang terdapat di dalam cairan kulit buah jambu mente juga mempunyai kapasitas sebagai antioksidan yang kuat dengan jalan menurunkan *reactive oksigen species* [Trevisan *et al.*, 2005]. Hal ini didukung oleh penelitian Cavalcante *et al.*, (2006) bahwa karotenoid, komponen fenol dan vitamin C yang terkandung di dalam *juice* buah semu jambu mente mempunyai kemampuan sebagai antioksidan. Diduga komponen-komponen tersebut dapat mereduksi metabolit aktif dengan menurunkan regulasi fase 1 enzim yaitu enzim yang dapat mengubah suatu senyawa menjadi bersifat karsinogen. Selain itu juga dapat memproteksi kerusakan DNA yang disebabkan oleh *reactive oksigen species* (ROS). Oleh karena itu, jika komponen fenol tersebut ditambahkan ke dalam bahan makanan (suplemen) dan dikonsumsi dalam jangka panjang dapat berperan sebagai agen kemopreventif kanker.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol kulit buah jambu mente (*Anacardium occidentale* L.) bersifat toksik terhadap sel mieloma dengan LC₅₀ sebesar 40,514 µg/mL..

DAFTAR PUSTAKA

Anonim. 1983. *American Type Culture Collection Catlog of Strain II*. 4th edition. Liss.Inc., New York. p. 61, 187,195.

- Castell, J. V., and M. J., Lechon. 1997. *In vitro Methods in Pharmaceutical Research*. Academic Press, London. p. 43.
- Casseret, L. J., and J. Doull. 1975. *Toxicology*. The Basic Science of Poiso, MacMillan Publishing Co Co. Ins., New York. p. 19-21, 112-113.
- Cavalcante, A. A. M., G. Rubensam., B. Erdtmann., M. Brendel., J. A. P. Henriques. 2005. Cashew (*Anacardium occidentale*) Apple Juice Lowers Mutagenicity of Aflatoxin B1 in *S. typhimurium* TA102. *J. Genet. Mol. Biol.* 28 (2): 1415-4757.
- Dhiani, B.A., E. Meiyanto., S. Riyanto. 2006. Uji Sitotoksisitas Ekstrak Metanol Daun Tanaman Cangkring (*Erythrina fusca* Lour.) dan Beberapa Isolatnya Terhadap Sel HeLa. *J. Farmasi Indonesia*. 04 (03): 192-203.
- Freshney, R. L. 2000. *Culture of Animal Cell*. A Manual of Basic Tecninique. 4th ed. John Wiley and Sonc Inc., New York. p. 336-338.
- Kubo, I., S. Komatzu., M. Ochi. 1986. Molluscasides from the Chasew *Anacardium occidentale* and Their Large-Scale Isolation. *J. Agric. Food Chem.* 34: 970-973.
- Kubo, I., H. Muroi., M. Himejima., V. Yamagiwa., V. Mera., V. Tokushima., V. Ohta., V. Kamikawa. 1993a. Structure Antibacterial Activity Relationships of Anacardic Acids, *J. Agric. Food Chem.* 41: 1016-1019.
- Kubo, I., M. Ochi., P. C. Vieira., and S. Komatsu. 1993b. Antitumor Agens from the Cashew (*Anacardium occidentale*) Apple Juice. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1012-1015.
- Mader, S. S. 2006. *Human Biology*. 9th ed. McGraw-Hill Companies, Inc., New York. p. 472-478.
- Meyer, B. N., N. R. Ferrigni., J. E. Putnam., L. B. Jacobsen., D. E. Nichols., J. L. McLaughlin, 1982. Brine Shrimp; A Convinient General Bioassay for Active Plant Constituent. *Planta Med.* 45: 31-34.
- Ola, A. R. B., Ikawati, Z., Sismindari, E. D. Meye., B. D. Tawa. 2008. Identifikasi Molekuler dan Aktivitas Antikanker Alkil Fenol Dari Minyak Kulit Buah Jambu Mete (*Anacardium occidentale*, l.) Asal Pulau Timor. *J. Farmasi Indonesia*. 19 (3): 142-143.
- Rang, H. P., M. M. Dole., J. M. Ritter., P. K. Moore. 2003. *Pharmacology*. 5th ed. Churcill Livingstone, New York. p. 69-77, 693-703.
- Trevisan, M. T. S., B. Pfundstein., R. Haubner., G. Wurtele., B. Spiegelhalder., H. Bartsch., R. W. Owen. 2006. Characterization of Alkyl Phenols in Chasew (*Anacardium occidentale*) Products and Assay of Their Antioxidant Capacity. *J. Food Toxy.* 44: 188-197.