



## Aktivitas antioksidan dan efek sitotoksik ekstrak Kola (*Cola nitida*) pada kulter sel kanker hati (HepG-2)

### *Antioxidant activities and cytotoxic effect of Cola nut extract (Cola nitida) on human liver carcinoma cell lines (HepG-2)*

Susi Endrini<sup>1</sup>, Himmi Marsiati<sup>1</sup>, Suherman J<sup>2</sup>, Fauziah O<sup>3</sup>, and Asmah R<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Medicine YARSI University, Jakarta

<sup>2</sup>Faculty of Medicine and Health, Muhammadiyah University of Jakarta

<sup>3</sup>Faculty of Medicine and Health Sciences, Universiti Putra Malaysia, Serdang, Selangor, D.E., Malaysia

**KEYWORDS** *cytotoxic effects; cola fruit extract; antioxidant; MTT; DPPH*

**ABSTRACT** *Liver cancer is one among cancers with increasing incidence in the world. Cola fruit (Cola nitida) is a fruit that is rich in properties and has been known since the Dutch colonial era. This fruit contains ingredients such as those contained in tea and chocolate such as methylxanthine and its derivatives. This study aims to determine the content of antioxidants and cytotoxic effects of cola fruit extracts obtained from Indonesia and Malaysia on liver cancer cell lines. Antioxidant content of fruit extracts of cola was assessed using DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate) and cytotoxic effects were studied using MTT (3 - (4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-diphenyltetrazolium bromide -2.5) on human liver cancer cell lines (HepG-2). The results showed that cola fruit from Malaysia contained high antioxidant with the IC<sub>50</sub> value of 37.2 µg/mL whereas IC<sub>50</sub> of value of its Indonesia's cola fruit was 66.0 µg / mL. The similar results have been shown in the cytotoxic test using HepG-2 liver cancer cell lines. Malaysia's cola fruit extract has a smaller IC<sub>50</sub> value of 6.5 µg / mL while the fruit extract of Indonesia's cola showed IC<sub>50</sub> value of 39.5 µg / mL. These values indicates that the fruit extract of cola is a potential anticancer activities especially on liver cancer. Further studies are required to clarify this hypothesis.*

Indonesia adalah Negara yang kaya akan sumber senyawa alami dengan beribu pulau dan kekayaan nabati yang masih belum sepenuhnya dapat digali dan dimanfaatkan khususnya untuk bahan obat-obatan. Salah satu tanaman yang dinyatakan kaya akan khasiat adalah buah kola (*Cola nitida*). Tanaman ini biasanya tumbuh di hutan dan tidak mengenal musim.

Tanaman kola masuk ke Indonesia sejak zaman penjajahan Belanda, awal abad ke-20. Buah kola diracik menjadi minuman penambah energi prajurit belanda pada waktu itu. Di dalam buahnya tersimpan sejumlah zat aktif yang dibutuhkan tubuh,

namun hingga hari ini masih belum diungkapkan secara saintifik (Bertha, 2003). Biasanya kola digunakan sebagai obat penenang, diuretic dan kardiotonik (Australian Naturopathic Network, 2006). Sebenarnya, tak hanya dapat digunakan sebagai obat, kola juga dapat digunakan sebagai penambah rasa pada permen, pudding atau jelly (ThirdAge, 2006). Di luar negeri, selain sebagai minuman berenergi,

**Correspondence:**

Susi Endrini, SSi, MSc, PhD., Department of Biochemistry, Faculty of Medicine YARSI University, Jakarta, Jalan Letjend. Suprpto, Cempaka Putih, Jakarta 10510, Telephone 021-4206674-76, Facksimile: 021-4243171

ekstrak kola diracik dan digunakan pada produk pelangsing multivitamin dan suplemen (Ballard, 2006). Kemungkinan buah ini kaya akan antioksidan karena buah kola mengandung senyawa metabolit sekunder yang mirip dengan teh dan kopi yaitu metilxantin. Akan tetapi uji secara ilmiah pada potensi buah ini sebagai bahan baku obat-obatan masih jarang.

Kanker merupakan salah satu penyebab kematian terbesar di dunia dan jumlahnya semakin meningkat setiap tahunnya. Salah satu jenis penyakit kanker yang kian meningkat kasusnya di dunia dan di Indonesia khususnya adalah penyakit kanker hati. Peningkatan ini diperkirakan terkait dengan peningkatan penularan virus hepatitis B dan C. Usaha penyembuhan dengan obat, pada umumnya belum memberikan hasil yang memuaskan, hal ini disebabkan karena pada umumnya obat-obat kemoterapi sintetik tidak bersifat selektif sehingga memberikan efek samping kepada sel normal.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak buah kola menggunakan metode DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate) dan menentukan efek sitotoksik ekstrak kola (*Cola nitida*) pada kultur sel kanker hati (HepG-2).

#### BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian ini dilakukan di Universitas YARSI dan Universiti Putra Malaysia. Buah kola diperoleh dari ladang herba Nasuha Sdn. Bhd, Malaysia dan buah kola Indonesia diperoleh dari Kebun Tanaman Obat Karyasari Bogor. Ekstrak buah kola yang digunakan adalah ekstrak metanol yang telah melalui uji pendahuluan dan dibuat sesuai dengan prosedur Ali *et al* (1990).

#### Uji Antioksidan dengan metoda DPPH

Dibuat larutan DPPH dalam metanol dengan konsentrasi  $2 \times 10^{-4} M$ . Dibuat serangkaian larutan sampel dengan variasi konsentrasi menggunakan pelarut metanol. Dari masing-masing larutan

ditambah 2 mL larutan DPPH, sehingga diperoleh serangkaian larutan dengan konsentrasi sampel yang berbeda, diamankan selama 30 menit (dihitung setelah penambahan larutan DPPH), diukur absorbansinya pada  $\lambda = 517 \text{ nm}$ . Data absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menentukan % inhibisi. Dari kurva % inhibisi versus konsentrasi sampel, dapat diperoleh nilai  $IC_{50}$  ekstrak dengan analisis statistik menggunakan regresi linear.

#### Pengkulturan sel kanker hati

Sel kanker hati HepG-2 dibeli dari American Type Culture Collection (ATCC, USA) dan ditumbuhkan dalam flask 25-cm<sup>2</sup> menggunakan medium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) yang diberi 5% Foetal Bovine Serum dan 100 IU/ml penisillin dan di simpan di dalam inkubator CO<sub>2</sub>, suhu 37°C.

#### Penentuan efek sitotoksik ekstrak menggunakan metode MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Mosmann, 1983)

Sel HepG-2 ditumbuhkan di dalam flask dan setelah konfluent sel kemudian dipanen dengan menggunakan tripsin. Sel ini kemudian dihitung menggunakan hemositometer dan sejumlah  $1 \times 10^5$  sel dimasukkan kedalam tiap sumuran dari mikroplate 96 sumuran. Kemudian dibiarkan semalaman pada suhu 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Setelah itu, ke dalam tiap sumuran ditambahkan seri dosis uji dengan replikasi 4 tiap dosis dan diinkubasi selama 12 jam, 24 jam, 48 jam dan 72 jam pada suhu 37°C, CO<sub>2</sub> 5%. Untuk kontrol dipakai media, kontrol pelarut dan kontrol sel tanpa ekstrak uji. Setelah periode waktu inkubasi sel, tiap sumuran ditambahkan 10ul MTT (5 mg MTT dalam 1 ml PBS steril), kemudian diinkubasi selama 4 jam pada 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Setelah itu, ke dalam tiap sumuran ditambahkan 100 ul isopropanol dan dibiarkan tercampur dengan rata kemudian absorbansinya dibaca dengan menggunakan ELISA microplate reader pada 540-570 nm.

## HASIL

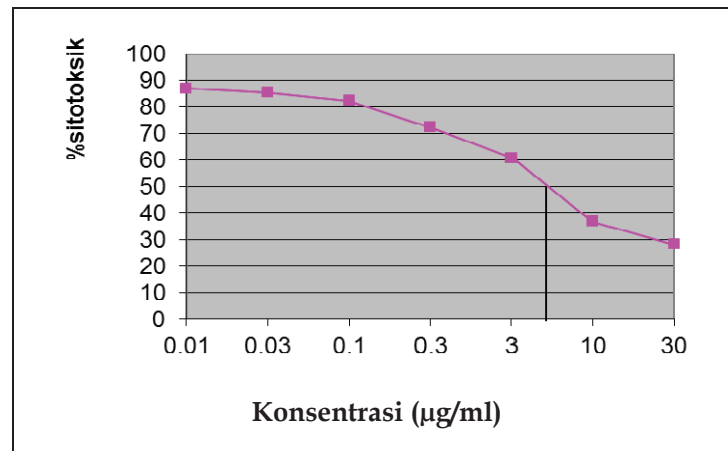
Hasil penelitian menggunakan metoda DPPH menunjukkan bahwa buah kola mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi tercermin dari nilai  $IC_{50}$  yaitu 37,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  untuk buah kola yang diperoleh dari Malaysia dan 66,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  untuk buah kola yang ditanam di Indonesia (Tabel 1).

Uji sitotoksik buah kola pada kultur sel kanker hati menunjukkan hasil yang selari dengan aktivitas antioksidannya. Gambar 1 menunjukkan efek sitotoksik buah kola yang diperoleh di Malaysia pada kultur sel kanker hati, HepG-2. Hasil pada

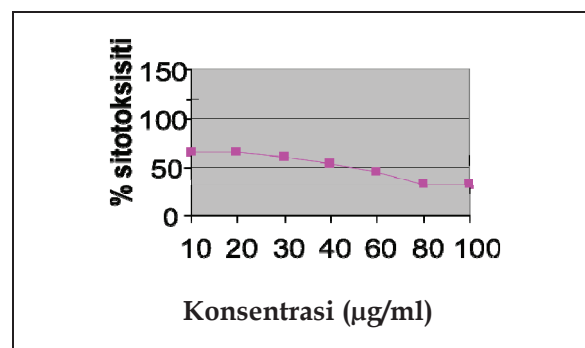
Gambar 1 menunjukkan nilai  $IC_{50}$  6,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  yang berarti bahwa ekstrak buah kola Malaysia ini potensial sebagai bahan yang bersifat antikanker hati. Di sisi lain, buah kola yang diperoleh dari Indonesia menunjukkan aktivitas yang sama, akan tetapi nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh adalah agak lebih besar yaitu 39,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Gambar 2).

Tabel 1. Aktivitas antioksidan buah kola

Asal Buah	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
Indonesia	66
Malaysia	37,2



Gambar 1. Efek ekstrak kola Malaysia pada kultur sel kanker hati, HepG-2. Diperoleh nilai  $IC_{50}$  6,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



Gambar 2. Efek ekstrak kola Indonesia pada kultur sel kanker hati, HepG-2. Diperoleh nilai  $IC_{50}$  : 39,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$

## PEMBAHASAN

Kanker hati merupakan salah satu jenis kanker yang makin meningkat jumlah penderitanya dari tahun ke tahun. Biasanya

penatalaksanaan kanker hati adalah melalui kombinasi antara pembedahan dan kemoterapi (Zhong *et al.*, 2010). Akan tetapi, kebanyakan agen kemoterapi dapat menimbulkan efek samping yang tidak di-

inginkan dan terdapat juga resistensi. Oleh karena itu, pencarian akan bahan yang dapat digunakan untuk membunuh sel kanker hati dan bersifat selektif terus dilakukan oleh para ahli. Beberapa pendekatan untuk mencari bahan-bahan yang dapat berpotensi sebagai agen kemoterapi selektif dapat dilakukan, antara lain melalui kajian antioksidan dan kandungan fitokimia suatu tanaman, ataupun bisa melalui kajian pada ekspresi gen, contohnya gen MDR1, yang dapat berkontribusi pada proses resistensi multi obat pada sel kanker hati (Shen *et al.*, 1991). Pada penelitian ini, aktivitas antioksidan dan sitotoksik buah kola diteliti. Dari riset sebelumnya didapati bahwa tanaman ini mengandung senyawa-senyawa kimia yang mirip dengan coklat. Beberapa riset telah membuktikan bahwa flavonoid yang terkandung didalam coklat berpotensi sebagai bahan antikanker (Maskarinec, 2009).

Aktivitas antioksidan adalah kemampuan suatu senyawa atau ekstrak untuk menghambat reaksi oksidasi yang dapat dinyatakan dengan persen penghambatan. Parameter yang dipakai untuk menunjukkan aktivitas antioksidan adalah harga konsentrasi efisien ( $EC_{50}$ ) atau konsentrasi inhibisi ( $IC_{50}$ ) yaitu konsentrasi suatu bahan antioksidan yang dapat menyebabkan 50% DPPH kehilangan karakter radikal. Bahan yang mempunyai aktivitas antioksidan tinggi, akan mempunyai nilai  $EC_{50}$  atau  $IC_{50}$  yang rendah. Adanya perbedaan aktivitas antara buah kola yang diperoleh dari Malaysia dengan buah kola dari Indonesia ini kemungkinan terkait dengan zat hara yang terkandung di tempat penanamannya. Akan tetapi keduanya sama-sama mengandung antioksidan yang tinggi. Untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan beberapa senyawa ataupun ekstrak bahan alam sering digunakan DPPH, karena DPPH adalah suatu radikal bebas yang stabil pada suhu kamar. DPPH dapat menerima elektron ataupun radikal hidrogen dan akan membentuk suatu molekul yang stabil. Apabila antioksidan berinteraksi dengan DPPH maka karakter radikal bebas dari DPPH akan dinetralkan.

Jika semua elektron pada radikal bebas DPPH menjadi berpasangan, maka warna larutan berubah dari ungu tua menjadi kuning terang. Perubahan ini dapat diukur secara stoikiometri sesuai dengan jumlah elektron atau atom hidrogen yang ditangkap oleh molekul DPPH karena interaksinya dengan bahan antioksidan (Gurav dkk., 2007).

Terdapat tiga langkah reaksi antara DPPH dengan bahan antioksidan. Langkah pertama adalah delokalisasi satu elektron pada gugus yang tersubstitusi para dari senyawa tersebut, kemudian memberikan atom hidrogen untuk mereduksi DPPH. Langkah kedua adalah dimerisasi antara dua radikal fenoksil, yang akan mentransfer radikal hidrogen yang akan bereaksi kembali dengan radikal DPPH. Langkah terakhir adalah pembentukan kompleks antara radikal aril dengan radikal DPPH. Pembentukan dimer maupun kompleks antara DPPH dengan bahan antioksidan tergantung pada kestabilan dan potensial reaksi dari struktur molekulnya (Brand-Williams, 1995).

Nilai sitotoksik pada buah kola ini kemungkinan terkait dengan aktivitas antioksidan buah kola yang tinggi. Disamping itu, buah kola juga mengandung bahan-bahan penting lainnya seperti yang terkandung dalam teh dan coklat (metilxantin dan turunannya) yang kemungkinan berperan pada aktivitas antioksidan dan efek sitotoksiknya. Menurut Bertha (2003), dalam 100 gr buah kola kering terkandung 2,35% kafein, 1,50% tannin, 0,59% lemak, 6,79% protein, 33,73% pati, 29,83% selulosa dan 3,33% abu.

## SIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak buah kola mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi dan bersifat sitotoksik terhadap kultur sel kanker hati, HepG-2 adalah potensial sebagai bahan anti kanker hati yang bersifat sitotoksik dan mengandung antioksidan tinggi.

**KEPUSTAKAAN**

- Ali AM, Macjen M, Hamid M, Lajis NH, El-Sharkawy S, and Murakoshi M 1996. Antitumor promoting and antitumor activities of the crude extract from leaves of *Juniperus chinensis*. *J. Ethnopharmacology* 53: 165-169.
- Australian Naturopathic Network 2006. *Cola nitida*. Available on internet at <http://www.ann.com.au/herbs/monographs/cola.htm>.
- Ballard GO 2006. The real truth about diet and weight loss. Available on internet at <http://www.titanlabs.com/scweightmanagement.htm>.
- Bertha H 2003. Buah hutan Multikhasiat, *TRUBUS*, 404 (34): 33 -36.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, and Berset C 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, *Lebensmittel-wissenschaft und Technologie*, 28, 25-30.
- Gurav S, Deshkar N, Gulkari V, Duragkar N, and Patil A 2007. Free Radical Scavenging Activity of *Polygala chinensis* Linn, *Pharmacologyonline*, 2: 245-253.
- Maskarinec G 2009. Cancer Protective Properties of Cocoa: A Review of the Epidemiologic Evidence. *Nutrition And Cancer*, 61 (5): 573-5799.
- Mosmann T 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods*. 65: 55-63.
- Shen DW, Lu YG, hin KV and Gottesman M 1991. Human hepatocellular carcinoma cell lines exhibit multidrug resistance unrelated to MSR1 gene expression. *Journal of Cell Sciences* 98: 317-322.
- Zhong X, Xiong M, Meng X and Gong R 2010. *Journal of Experimental and Clinical cancer Research*. 29: 115