

## Pemakaian Sel Hela dalam Uji Sitotoksisitas Fraksi Ethanol Biji Mimba (*Azadirachta indica*)

Ira Djajanegara dan Priyo Wahyudi

Pusat Teknologi Bioindustri BPPT

### Abstract

Traditionally, the neem (*Azadirachta indica*) seeds have been used as bioinsecticide. It was also used and known for long time as a fungicide and anti bacterial agents. Pre-toxicity experiment using brine shrimp lethality test (BSLT) method indicated that the ethanol fraction of the neem seeds was toxic to the shrimp larvae with LC<sub>50</sub> 38.79 µg/ml. This experiment was done to further investigate the possible role of ethanol fraction of neem (*A. indica*) seeds as an anti cancer agent using HeLa cell lines. Experiment was initiated by extracting the seeds using n-hexane by maceration. The macerate was then macerated further using 70% ethanol as solvent. The ethanol fraction was used in cytotoxicity assay using (cervix cancer) HeLa cell lines. Cytotoxicity assay was done by using direct counting method. The amount of living cells were observed and counted, death percentage was determined and probit analysis used to determine the LC<sub>50</sub> value. LC<sub>50</sub> value for ethanol fraction from the seeds of neem (*A. indica*) was 10.95 µg/ml for 24 hours; 7.33 µg/ml for 48 hours and 4.37 µg/ml for 72 hours based on cytotoxicity analysis using HeLa cells. This experiment concluded that the neem (*A. indica*) seeds have cytotoxicity toward HeLa cell lines which confirmed the previous toxicity experiment using brine shrimp lethality test (BSLT) method. Overall, this experiment indicated that neem (*A. indica*) seeds have anticancer activity.

**Key words:** seed, neem, citotoxicity, HeLa cell lines

### Pendahuluan

Telah banyak dilakukan penelitian tentang pemanfaatan obat tradisional antara lain farmakologi eksperimental toksisitas dan efek samping serta isolasi dan penelaahan struktur zat kandungan dari tanaman obat yang ada di Indonesia (Syukur dan Herman, 2001). Saat ini penelitian dimaksudkan untuk mencari zat kandungan aktif dari suatu tanaman obat dalam rangka penemuan obat-obatan baru dan juga bertujuan untuk mendapatkan bahan dasar dalam pembuatan obat (Syamsul *et al.*, 1990).

Salah satu tanaman yang telah lama digunakan sebagai obat tradisional adalah mimba (*A. indica*) (Backer dan Brink, 1963). Di Jawa, tumbuhan tersebut dikenal dengan nama mimba (Hyne, 1987). Adapun sebutan tumbuhan tersebut dalam bahasa Inggris antara lain adalah neem, nim, margosa, Indian lilac, bead tree, pride of china, holy tree dan persian lilac (Gruenwald *et al.*, 1998).

Mimba mengandung senyawa triterpen dan tetraterpen (limonoid, protolimonoid dan kelompok genudin). Pada minyak bijinya terdapat nimbolin A dan B, nimbin, dan gedunin. Sementara tanin dan minyak atsiri terdapat pada kulit kayu dan daunnya (Gruenwald *et al.*, 1998). Metabolit yang ditemukan dari *A. indica* antara lain disetil vilasinin, nimbandiol, 3-desasetil salanin, salanol dan azadirachtin.

Selama ini, daun mimba digunakan untuk penambah nafsu makan, menanggulangi disentri, borok, malaria dan antibakteri. Selain itu masyarakat banyak menggunakan minyak mimba untuk eksema, kepala kotor, dan kudis, sedangkan kulitnya untuk mengatasi gangguan lambung (Sudarsono *et al.*, 2002).



Gambar 1. Biji-biji mimba (*A. indica*)  
Figure 1. The neem seeds (*A. indica*)

Meskipun telah diketahui bahwa tanaman mimba memiliki banyak kegunaan, namun kemungkinan penggunaan mimba sebagai zat anti kanker belum banyak diteliti. Penyakit kanker merupakan salah satu ancaman utama terhadap kesehatan. Usaha pengobatan kanker secara intensif telah dilakukan, namun hingga saat ini belum ditemukan obat yang dapat mengatasi penyakit tersebut secara memuaskan. Hal tersebut disebabkan rendahnya selektivitas obat-obatan antikanker yang digunakan atau karena patogenesis kanker itu sendiri belum jelas benar.

Guna mendukung upaya pencarian obat kanker yang lebih spesifik, saat ini banyak dilakukan penggalian potensi dari bahan-bahan alami. Salah satunya adalah penelitian sitotoksitas biji mimba terhadap sel HeLa. Sel HeLa merupakan *continuous cell lines* yang tumbuh semi melekat sehingga dapat dipakai untuk mewakili sel-sel lain yang sejenis. Sel ini diturunkan dari sel epitel kanker leher rahim (*cervix*) manusia. Sel HeLa cukup aman dan merupakan sel manusia yang umum digunakan untuk kepentingan kultur sel (Khotimah, 2004).

Berdasarkan penelitian sebelumnya dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) terhadap larva *Artemia salina* diperoleh nilai  $LC_{50}$  biji mimba sebesar 38.79  $\mu\text{g/ml}$  (Sari, 2006) Hasil tersebut menunjukkan adanya bioaktivitas dari ekstrak biji mimba sehingga perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan uji sitotoksitas ekstrak ethanol 70% dari biji mimba secara *in vitro*. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui adanya efek sitotoksik beserta nilai  $LC_{50}$  dari ekstrak ethanol 70% biji mimba sebagai obat antikanker yang diujikan pada sel HeLa sehingga nantinya dapat dikembangkan sebagai obat alternatif pada pengobatan kanker.

### Bahan dan Metode

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain biji mimba dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BPTO) yang telah dideterminasi di Herbarium Bogoriensis, Bogor. Beberapa bahan kimia yang dipakai untuk mengidentifikasi golongan kimianya (uji kandungan alkaloid, tanin, flavonoid, triterpenoid dan sterol) antara lain HCl, larutan Bouchardat, Dragendoroff dan Mayer, NaCl,  $\text{FeCl}_3$ , gelatin-NaCl, petroleum benzene P, serbuk Mg, pereaksi Lieberman Bouchard, ethanol 96%, methanol, ethyl asetat P, petroleum benzene P,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dan  $\text{CH}_3\text{COOH}$  anhidrat. Bahan-bahan lain adalah media RPMI 1640, larutan PBS (phosphate buffer saline), larutan trypsin, larutan tripan biru, DMSO, penicillin-streptomisin 1%, fungison, Natrium bikarbonat, dinatrium hidrogen fosfat, kalium dihidrogen fosfat, natrium klorida, doxorubicin dan cisplatin sebagai kontrol positif karena merupakan obat anti kanker golongan kompleks platinum.

Penelitian dimulai dengan mengidentifikasi golongan kimia dari biji mimba (Departemen Kesehatan RI, 1989; Harborne, 1996). Hal tersebut dilakukan untuk memastikan adanya kandungan alkaloid, triterpenoid, sterol, flavonoid dan tanin dalam biji mimba yang akan dipakai pada penelitian ini.

Langkah selanjutnya adalah mengekstrak bahan aktif dari biji mimba dengan maserasi bertingkat menggunakan n-heksan diikuti 70% ethanol. Sebanyak 1 kg simplisia kering direndam dengan 2 liter n-heksan dalam toples kaca yang bermulut lebar, dibiarkan selama 3 hari. Selama perendaman dilakukan pengadukan beberapa kali, kemudian disaring dengan kertas saring. Perendaman n-heksan dilakukan sebanyak 2

kali. Setelah perendaman akan diperoleh maserat heksan dan ampas. Maserat heksan diabaikan, sedangkan ampas kembali direndam dengan 2 liter ethanol 70%. dan dibiarkan selama 3 hari. Selama perendaman dilakukan pengadukan beberapa kali, kemudian disaring menggunakan kertas saring. Perendaman dengan ethanol dilakukan sebanyak 2 kali. Maserat ethanol yang diperoleh dipekatkan dengan penguap vakum sehingga diperoleh ekstrak ethanol yang kemudian disimpan pada suhu ruang. Fraksi ini kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 105°C selama 1 jam hingga diperoleh bobot tetap (Departemen Kesehatan RI, 1995). Fraksi ethanol 70% tersebut kemudian dihitung rendemen dan bobot jenisnya. Fraksi tersebut diatas juga dihitung susut pengeringannya sesuai cara yang dilakukan Departemen Kesehatan (Departemen Kesehatan RI, 1989).

Pembuatan larutan uji ekstrak ethanol 70% dari biji mimba dilakukan dengan mengambil masing-masing ekstrak sebanyak 50 mg untuk dilarutkan dalam labu ukur 10 ml sehingga diperoleh konsentrasi induk 5000 µg/ml dengan 0.25% DMSO. Dari larutan induk tersebut, dibuat pengenceran dengan konsentrasi 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62 dan 7.81 µg/ml. Cisplatin, yang dipakai sebagai kontrol positif, dibuat konsentrasi 30, 25, 20, 15, 12.5, 10, 8 dan 6 µg/ml. Sedangkan kontrol positif lain yaitu doxorubicin dibuat konsentrasi 30, 25, 20, 15, 12.5, 10, 5 dan 2.5 µg/ml.

Pembuatan media RPMI 1640, larutan phosphate saline buffer (PBS), larutan trypsin dan larutan tripan biru dilakukan sesuai metoda yang dilakukan oleh Freshney (1987). Pengaktifan, pembiakan dan pengembangan sel HeLa dilakukan sesuai metode yang dipakai oleh oleh Freshney (1987). Kepadatan sel HeLa dihitung menggunakan haemocytometer. Sebelum dihitung, 20 µl suspensi sel dicampur dengan 180 µl biru tripan. Penghitungan dilakukan di bawah mikroskop pada perbesaran 100 X. Penghitungan sel dilakukan pada 4 bilik hitung yang masing-masing terdiri dari 16 kotak dan diambil rata-ratanya, kemudian dikalikan dengan faktor pengenceran dan faktor koreksi untuk setiap bidang besar (volumenya 10<sup>-4</sup> ml).

Jumlah sel dihitung dengan rumus :  $\frac{n}{4} \times P \times 10^4 \text{ sel/ml}$

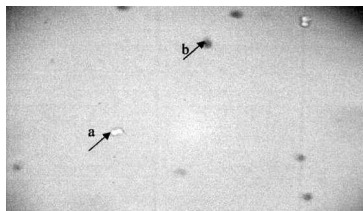
*dimana* n = jumlah sel dalam 4 bilik

4 = jumlah bilik *haemocytometer* yang dihitung

10<sup>4</sup> = 1 ml per kapasitas *haemocytometer*

P = faktor pengenceran

Uji sitotoksisitas secara *in vitro* ini dilakukan karena lebih cepat, murah dan hanya membutuhkan sedikit bahan uji jika dibandingkan dengan pengujian secara *in vivo*. Perhitungan sel menggunakan metode penghitungan langsung yang selanjutnya dilakukan *doubling time* dengan masa inkubasi 24, 48 dan 72 jam. Kepadatan sel dihitung dengan *haemocytometer* setelah pemberian warna dengan tripan biru sebanyak 50 µl ke dalam tiap sumuran sel. Prinsip pewarnaan dengan tripan biru yaitu sel yang telah mati akan terlihat berwarna biru karena sel yang telah mengalami lisis maka protein dalam plasmanya berikatan dengan tripan biru (Gambar 2). Data yang diperoleh berupa sel yang mati dan hidup, namun perhitungan untuk mendapatkan persen kematian dihitung dari persen viabilitas, sebab sel yang mudah dilihat dan dihitung adalah sel yang hidup karena bentuknya masih utuh dan terlihat bening. Sedangkan sel yang mati akan lebih sulit dihitung karena sel mengalami lisis dan nekrosis sehingga bentuknya sudah tidak beraturan. Cara penghitungan dengan *haemocytometer* yaitu sel yang menyinggung garis batas sebelah kiri atau garis atas dihitung, sedangkan sel yang menyinggung garis batas sebelah kanan atau garis bawah tidak dihitung (Gambar 3). Seri konsentrasi dilakukan sebanyak tiga kali untuk mendapatkan hasil yang lebih valid. Persen kematian dihitung dari data jumlah sel yang hidup kemudian ditransformasikan ke tabel probit untuk menentukan LC<sub>50</sub>.



Gambar 2. a) Sel HeLa yang masih hidup terlihat jernih; b) Sel HeLa yang mati bereaksi dengan biru tripan

Figure 2. a) Life HeLa cell; b) Death HeLa cell reacted with tripan blue

Uji sitotoksitas menggunakan metode penghitungan langsung (*viable cell count*) dilakukan dengan cara membagi 5 kelompok pengujian yaitu media ditambah sel sebagai kontrol negatif, sel ditambah pelarut (yaitu DMSO) sebagai kontrol pelarut, sel ditambah cisplatin sebagai kontrol positif yang dibuat sebanyak 8 konsentrasi yaitu 30, 25, 20, 15, 12.5, 10, 8 dan 6  $\mu\text{g/ml}$ . Sedangkan kontrol positif lainnya, yaitu doxorubicin dibuat sebanyak 8 konsentrasi yaitu 30, 25, 20, 15, 12.5, 10, 5 dan 2.5  $\mu\text{g/ml}$ . Pengujian ekstrak ethanol 70% dilakukan dengan 8 konsentrasi yaitu 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62 dan 7.81  $\mu\text{g/ml}$ . Sel diinkubasi selama 24, 48 dan 72 jam untuk mendapatkan nilai  $\text{LC}_{50}$  pada berbagai konsentrasi. Masing-masing konsentrasi tersebut dimasukkan ke dalam lempeng dengan 96 sumuran sebanyak 100  $\mu\text{l}$  dan ditambahkan suspensi sel sebanyak 100  $\mu\text{l}$ . Seri kadar diulang tiga kali (*triplo*) agar lebih valid. Kultur kemudian diinkubasi sesuai waktu inkubasi yang telah ditentukan pada  $37^{\circ}\text{C}$ . Jumlah sel yang hidup (berwarna kuning) dan mati (berwarna biru) dihitung dengan cara mengambil 50  $\mu\text{l}$  dan direaksikan dengan tripan biru sebanyak 50  $\mu\text{l}$  selama 3 menit. Hasil reaksi tersebut disuspensi dan diambil 10  $\mu\text{l}$  untuk dihitung jumlah selnya. Presentase kematian sel dihitung menggunakan metode penghitungan langsung (*viable cell count*) sesuai rumus yang dipakai oleh Doyle dan Griffith (2000) yaitu :

$$\% \text{ viabilitas} = \frac{\text{jumlah sel yang hidup}}{\text{jumlah sel yang hidup} + \text{mati}} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = 100\% - \% \text{ viabilitas}$$

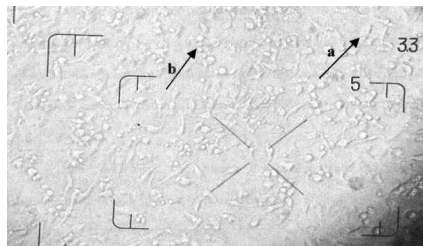
Nilai persen kematian yang diperoleh dari masing-masing konsentrasi diubah ke dalam angka probit dengan menggunakan tabel probit. Selanjutnya, dibuat persamaan regresi linier untuk melihat hubungan antar perlakuan dengan kematian sel HeLa. Perhitungan dengan cara probit ini diulangi dengan memasukkan angka 5 sebagai probit ke dalam persamaan regresi linier, hasilnya kemudian disubstitusi dan dianti-logaritma untuk mendapatkan nilai  $\text{LC}_{50}$ .

### Hasil dan Pembahasan

Metode ekstraksi yang dipakai dalam uji sitotoksitas ini adalah metode maserasi. Metode tersebut dilakukan dengan tujuan untuk menarik zat-zat berkhasiat yang berada dalam simplisia, selain itu juga cara pengerjaan dan peralatannya mudah serta sederhana digunakan. Maserasi dilakukan dengan menggunakan pelarut n-heksan terlebih dulu untuk menarik senyawa yang non polar sehingga diperoleh senyawa bersifat polar. Menurut penelitian sebelumnya senyawa polar dari biji mimba lebih toksik dibandingkan dengan yang non polar (Sari, 2006). Setelah penarikan senyawa non polar dengan n-heksan, kemudian dilakukan hal yang sama dengan 70% ethanol. Penggunaan ethanol dikarenakan ethanol merupakan cairan penyari yang mudah menguap sehingga waktu yang dibutuhkan untuk memekatkan dan mengeringkan ekstrak menjadi lebih singkat. Ethanol juga membantu melindungi ekstrak dari kontaminasi oleh mikroba.

Pemilihan ethanol 70% sebagai pelarut diharapkan dapat menarik zat-zat berkhasiat yang terdapat dalam simplisia. Dari hasil uji identifikasi golongan kimia terbukti bahwa ekstrak ethanol 70% yang akan diujikan mengandung beberapa senyawa yang berkhasiat seperti alkaloid, triterpenoid, sterol, flavonoid, dan tanin. Biji mimba mengandung 20% - 50% minyak (Sutamo dan Atmowidjojo, 2000). Kandungan yang paling banyak ditemukan dalam biji mimba adalah tetranortriterpenoid yang salah satunya adalah azadirachtin dan senyawa ini yang diduga berpotensi sebagai anti kanker (Sari, 2006).

Sel HeLa merupakan jenis sel yang semi melekat pada *flask* karena terdapat protein membran matriks ekstraseluler pada permukaan sel yang melekat pada *flask*, maka diperlukan tripsin untuk memecah ikatan peptida dari protein matriks ekstraseluler tersebut sehingga sel akan terlepas dari *flask* dan melayang dalam media. Dalam kondisi seperti ini larutan bahan uji akan terekspos sempurna ke semua bagian sel.



Gambar 3. a) Sel HeLa yang mati; b) Sel HeLa yang masih hidup  
Figure 3. a) Death HeLa cell; b) Life HeLa cell

Uji sitotoksisitas yang dilakukan memperlihatkan bahwa cisplatin lebih toksik dari pada doxorubicin terhadap sel HeLa, hal ini terlihat dari nilai  $LC_{50}$  cisplatin yang sebesar 0.42  $\mu\text{g/ml}$  dibandingkan doxorubicin yang sebesar 0.6  $\mu\text{g/ml}$ . Tidak mengherankan cisplatin merupakan obat terpilih untuk pengobatan kanker serviks. Cisplatin dan doxorubicin merupakan obat yang berpengaruh pada siklus sel nonspesifik yang dapat menghambat sintesis DNA dan RNA dari sel kanker pada saat siklus sel, khususnya ketika sel berada pada fase G1 dan S. Di sisi lain, doxorubicin bekerja pada fase S dari siklus sel (Siswandono dan Sukarjo, 2000).

Pada larutan uji ekstrak ethanol 70% diperoleh  $LC_{50}$  sebesar 10.95  $\mu\text{g/ml}$ ; 7.33  $\mu\text{g/ml}$  dan 4.37  $\mu\text{g/ml}$  untuk masa inkubasi selama 24; 48 dan 72 jam. Dari hasil penelitian ini terlihat bahwa semakin lama masa inkubasi maka akan diperoleh nilai  $LC_{50}$  yang semakin kecil yang berarti sitotoksisitas meningkat dengan meningkatnya lama inkubasi. Suatu zat dikatakan sitotoksik dan berpotensi antikanker apabila nilai  $LC_{50} \leq 30$   $\mu\text{g/ml}$  (Meyer *et al.*, 1982). Dalam hal ini maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak ethanol dari biji mimba bersifat sitotoksik sehingga dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai obat antikanker.

Mekanisme kerja produk tanaman sebagai antikanker misalnya alkaloid dari *Vinca* sp. umumnya bekerja menghambat pembentukan komponen mikrotubuli pada kumparan mitosis sehingga metafase terhenti. Pada golongan diterpenoid yang diekstrak dari tanaman bekerja sebagai zat antikanker dengan meningkatkan polimerisasi tubulin dimana kestabilan yang berlebih dari polimer mikrotubuli menyebabkan hambatan mitosis pada fase G<sub>2</sub> dan M (Siswandono dan Sukarjo, 2000). Dari hasil penelitian ini golongan triterpenoid yang terdapat pada ekstrak ethanol biji mimba diduga menghambat siklus sel sehingga bersifat sitotoksik.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak 70% ethanol dari biji mimba dapat digunakan sebagai obat antikanker terhadap kanker serviks yang tidak menutup kemungkinan juga dapat digunakan pada kanker-kanker lainnya. Untuk memisahkan zat yang bersifat sitotoksik tersebut maka perlu dilakukan isolasi lebih lanjut sehingga daya kerja bahan alami dari biji mimba dapat lebih efektif.

## Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak 70% ethanol biji mimba (memiliki sifat sitotoksik terhadap sel HeLa dengan nilai  $LC_{50}$  pada masa inkubasi 24 jam sebesar 10.95  $\mu\text{g/ml}$ , 48 jam sebesar 7.32  $\mu\text{g/ml}$  dan pada masa inkubasi 72 jam sebesar 4.36  $\mu\text{g/ml}$ . Semakin lama masa inkubasi maka semakin meningkat daya sitotoksitas dari ekstrak 70% ethanol yang diujikan.

## Daftar Pustaka

- Backer, C. and Brink, V., 1963. Flora of Java, Vol II, N.V.P. Noordhoff Gronongen. The Netherland. Hal 117-120.
- Departemen Kesehatan RI., 1989. Materia Medika Indonesia, jilid V. Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Departemen Kesehatan RI., 1995. Materia Medika Indonesia, jilid II. Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Doyle, A. and Griffiths, J.B., 2000. Cell and Tissue Culture for Medical Research. John Wiley & Sons, LTD. New York. Hal 12 – 16, 48 – 49, 409.
- Freshney, R.I., 1987. Animal Cell Culture, A Practical Approach. 1<sup>st</sup> Edition. IRL Press. Washington DC. Hal 3, 38, 183 – 188, 309 – 312, 329 – 330, 336 – 337.
- Gruenwald, J., Brendler, T., and Jeanicke, C., 1998. Physician's Desk Reference for Herbal Medicine, 1<sup>st</sup> edition. Medical Economic Company, Montvale, NJ.
- Harborne, 1996. Metode Fitokimia. Terbitan kedua. Terjemahan dari: Phytochemical methods. Oleh: Padmawinata, Kosasih, Iwan S. ITB. Bandung. Hal. 6, 147.
- Hyne, A., 1987. Tumbuhan Berguna Indonesia, jilid III. Badan Litbang Kehutanan, Jakarta.
- Khotimah, K., 2004. Uji sitotoksitas dan antiproliferasi fraksi petroleum eter dan fraksi ethanol kulit batang kamboja (*Plumeria acuminata*) terhadap sel HeLa. Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta. Hal. 21.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobson, L.B., Nicholas, D.E., and McLaughlin, J.L., 1982. Brine shrimp : A convenient general bioassay for active plant constituent. *Planta Medica* 45: 31 – 34,.
- Sari, A., 2006. Uji toksisitas ekstrak ethanol 70% biji mimba (*Azadirachta indica*) fraksi n-heksan, fraksi etil-asetat dan fraksi air terhadap *Artemia salina*. Skripsi. UHAMKA, Jakarta
- Siswandono dan Sukarjo, B., 2000. Kimia Medisinal, edisi II. Airlangga University Press, Surabaya. Hal. 163 – 165.
- Sudarsono, Gunawan, D., dan Wahyono, S., 2002. Tumbuhan Obat II, Hasil Penelitian, Sifat-sifat dan Penggunaan. Pusat Studi Obat Tradisional Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.
- Sutamo, H. dan Atmowidjojo, S., 2000. Pengenalan dan Pemanfaatan Tumbuhan Penunjang, seri 2. Prosea Bogor, Indonesia. Hal. 56 – 57.
- Syukur, C. dan Herman, 2001. Budidaya Tanaman Obat Komersial. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Syamsul, A.A., 1990. Flavonoid and Phytome Diaca. Kegunaan dan Prospek I (2): 120 -127.