



*Antidesma bunius* (L.) Spreng (Buni) merupakan salah satu tanaman yang berpotensi untuk dikembangkan menjadi obat antikanker. Daun dan kulit batang tanaman ini mengandung alkaloid, saponin, tanin dan flavonoid, sedangkan akarnya mengandung senyawa saponin dan tanin (Arland 2006). *Antidesma bunius* (L.) Spreng yang dikenal sebagai tanaman buni, banyak digunakan masyarakat sebagai obat tradisional untuk mengobati darah tinggi, jantung berdebar, kurang darah, sifilis (Wijayakusuma *et al.* 2002) dan kanker (Micor *et al.* 2005).

Penelitian beberapa tumbuhan yang termasuk dalam marga *Antidesma* menunjukkan adanya efek antibakteri dari *Antidesma madagascariensis* (Narod *et al.* 2004), efek antiinflamasi dan diuretik ditunjukkan oleh *Antidesma menasu* (Rizvi *et al.* 2005) dan efek sitotoksik terhadap sel MCF-7 (kanker payudara) dan sel SF-268 (kanker otak) secara *in vitro* ditunjukkan oleh *Antidesma pentandrum* (Chen 2004). Dengan menggunakan dasar kemotaksonomi sangat dimungkinkan jika tanaman buni mengandung senyawa yang bersifat sitotoksik dan potensial untuk dikembangkan menjadi obat antikanker.

Pengujian praskrining antikanker terhadap *Antidesma bunius* (L.) Spreng dengan metode BST menunjukkan ekstrak metanol daun dan buah buni memiliki efek toksik pada *Artemia salina* Leach (Micor *et al.* 2005).

Uji Kematian Larva Udang Laut (BST) merupakan uji penapisan awal dalam upaya mencari obat alamiah untuk terapi kanker. Apabila ekstrak tanaman tersebut memiliki efek toksik maka penapisan dilanjutkan dengan uji sitotoksitas terhadap kultur sel kanker. Berdasarkan uraian tersebut maka perlu dilakukan penelitian lanjutan berupa uji sitotoksitas terhadap kultur sel HeLa, yang merupakan jenis kanker leher rahim.

Pada penelitian ini uji sitotoksitas dilakukan dengan metode penghitungan langsung di bawah *inverted microscope*. Sel yang masih hidup akan tampak seperti daun dan bersinar cemerlang, batas membran dengan media akan kelihatan jelas. Sedangkan sel yang mati akan tampak bulat, gelap, tidak bercahaya, dan membran selnya terlihat pecah atau agak samara. Data yang diperoleh dari metode ini berupa persentase sel hidup. Selanjutnya ditentukan nilai  $EC_{50}$  yaitu konsentrasi larutan uji yang menghambat 50% pertumbuhan sel

dengan selang kepercayaan 95 % menggunakan analisis probit.

## METODE

### Preparasi bahan dan alat

Bahan penelitian adalah buah buni (*Antidesma bunius* (L.) Spreng.) yang diperoleh dari daerah Jember, Media RPMI, FBS, PBS, Kultur sel HeLa, Penisilin-Streptomisin, DMSO, Metanol, Fungizone. Alat penelitian meliputi Plate 96 sumuran, *yellow tip*, *blue tip*, *eppendorf tube*, *conical flask*, botol reagen 100 mL, botol reagen 250 mL, pipet pasteur, *culture flask*, *haemocytometer*, *laminar air flow cabinet*, *inkubator*, *inverted microscope*, *rotavapour*.

### Penyediaan bahan uji

Simplisia serbuk buah buni (*A. bunius*) yang diperoleh dengan mengeringkan dengan dianginkan buah buni yang sudah masak, sebanyak 100 gram serbuk diekstraksi dengan metode remaserasi menggunakan pelarut metanol sebanyak 3,525 liter sehingga dihasilkan ekstrak kental dengan rendemen 4,084 %. Konsentrasi ekstrak yang digunakan sebagai larutan uji adalah 7-2000 µg/mL.

### Pembuatan ekstrak metanol

Ekstraksi dilakukan dengan maserasi serbuk buah sebanyak 100 g serbuk menggunakan metanol hingga serbuk buah terendam sempurna dan penyari berada 2 cm di atas serbuk sebanyak 3x masing-masing selama 2 x 24 jam sambil sesekali digojog. Sari yang diperoleh disebut sari metanol. Sari metanol selanjutnya diuapkan hingga diperoleh ekstrak kental.

### Kultur sel

Sel diambil dari tangki nitrogen cair, segera dicairkan dalam penangas air 37 °C, kemudian ampul disemprot dengan etanol 70 %. Ampul dibuka dan sel dipindah ke dalam tabung *conical* steril yang berisi medium RPMI 1640. Suspensi sel disentrifus 325 g selama 5 menit. Supernatan dibuang, pellet ditambah 1 ml medium penumbuh yang mengandung 20 % PBS, diresuspensi perlahan hingga homogen, kemudian sel ditumbuhkan dalam beberapa (3 – 4) buah *tissue culture flask* kecil, diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37 °C dengan aliran 5 % CO<sub>2</sub>. Setelah 24 jam, medium diganti dan sel ditumbuhkan hingga konfluen dan jumlahnya cukup untuk penelitian.

Setelah jumlah sel cukup, medium diganti dengan medium RPMI 1640 baru sebanyak 5 ml dan sel dilepaskan dari dinding flask menggunakan *scraper*. Sel dipindah ke tabung *conical* steril dan ditambah medium RPMI sampai volume 10 ml dan disentrifus 325 G selama 5 menit. Sel dicuci dua kali menggunakan medium yang sama, dan dihitung jumlah selnya menggunakan *haemocytometer*. Suspensi sel ditambah sejumlah medium sehingga

diperoleh konsentrasi sel sebesar  $3 \times 10^4$  sel/100  $\mu$ l dan siap untuk diteliti.

#### Uji sitotoksitas

Sel didistribusikan ke dalam sumuran dengan kepadatan 20.000 menggunakan medium antibiotik dan diinkubasi bersama larutan uji satu seri kadar selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, masing-masing sumuran diresuspensi dan dihitung jumlah sel yang hidup secara manual di bawah *inverted microscope* dengan bantuan *haemocytometer*. Pada saat uji sitotoksitas, digunakan seri kadar ekstrak metanol sebesar sebesar 3,9 - 500  $\mu$ g/ml.

#### Analisis data

Data sel hidup yang telah diperoleh digunakan untuk menghitung persentase kematian sel dengan rumus:

$$\% \text{ kematian} = \frac{\sum \text{ sel hidup kontrol} - \sum \text{ sel hidup perlakuan}}{\sum \text{ sel hidup kontrol}} \times 100$$

Data tersebut kemudian dianalisis menggunakan analisis probit untuk memperoleh harga  $IC_{50}$  (konsentrasi yang mampu menghambat pertumbuhan sel HeLa sebesar 50 %).

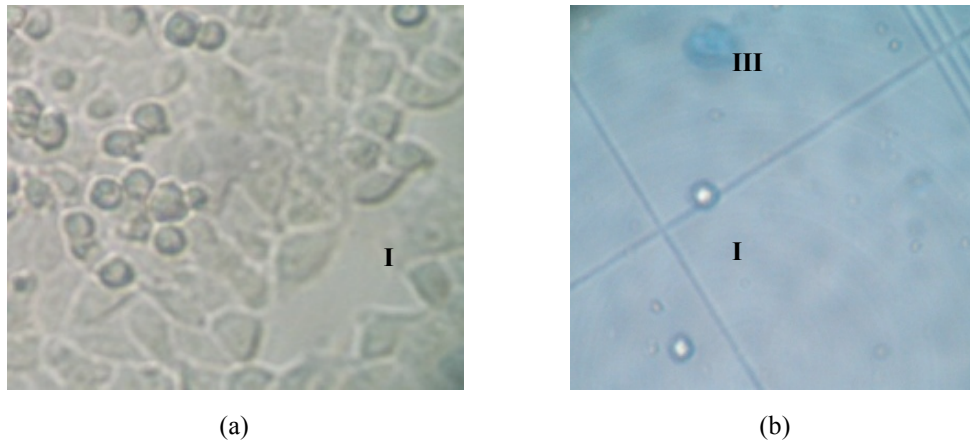
### HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji sitotoksitas dilakukan untuk mengetahui kemampuan pembunuhan sel (sitotoksik) ekstrak metanol buah buni (*A. bunius*) yang selanjutnya disebut larutan uji terhadap sel HeLa. Pengamatan sel yang hidup dan mati dilakukan dengan penghitungan langsung di bawah *inverted microscope*. Sel yang masih hidup akan tampak seperti daun dan bersinar cemerlang, batas membran dengan media akan kelihatan jelas. Sedangkan sel yang mati akan tampak bulat, gelap, tidak bercahaya, dan membran selnya terlihat pecah atau agak samar. Morfologi sel yang hidup dan mati sebelum dan sesudah pemberian larutan uji dapat dilihat pada Gambar 1. Sedangkan data prosentase kematian sel HeLa dapat dilihat pada Tabel 1.

Dari morfologi sel HeLa dan data persentase pengujian ekstrak dapat diketahui adanya efek toksik yang ditimbulkan oleh larutan uji dan dapat diamati adanya fenomena *dose dependent*. Terdapat korelasi antara konsentrasi larutan uji dengan sitotoksitasnya. Seiring dengan bertambahnya konsentrasi, jumlah sel yang mati semakin banyak. Hal ini mengakibatkan semakin

tinggi konsentrasi larutan uji, semakin rendah absorbansi sumuran sehingga persen kehidupannya semakin kecil. Sedangkan pada kontrol DMSO, tidak terdapat korelasi yang signifikan antara konsentrasi dan persen kehidupan jika dibandingkan dengan kontrol sel. Berdasarkan analisis probit antara konsentrasi larutan uji dengan persentase kematian diperoleh harga  $IC_{50}$  3.117  $\mu$ g/ml dan nilai koefisien regresi ( $r$ ) 0,96. Perbedaan antara harga  $LC_{50}$  yang diperoleh dengan metode BST dan sitotoksitas menunjukkan bahwa tidak semua uji praskrining dengan BST akan berkorelasi dengan uji sitotoksitas pada sel kanker. Derajat keterpercayaan antara uji BST dengan uji sitotoksitas lebih tinggi sitotoksitas karena pada uji BST menggunakan suatu larva dan bukan spesifik sel kanker. Ketidakkorelasi antara BST dengan uji sitotoksitas dapat disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya karena perbedaan metode pengujian yang digunakan. Uji kematian larva udang merupakan salah satu metode uji bioaktif pada penelitian senyawa bahan alam. Sebagai metode praskrining maka metode ini bukanlah metode yang spesifik untuk uji antikanker, karena uji ini juga dapat digunakan untuk mengetahui residu peptisida, anestetik lokal, senyawa turunan morfin, mitotoksin, karsinogenitas suatu senyawa, dan polutan air laut.

Ekstrak metanol merupakan ekstrak yang kandungan senyawanya masih beragam, dari yang non polar sampai yang polar. Senyawa yang dapat masuk sari metanol diantaranya adalah flavonoid, terpenoid dan lipid. Berdasarkan kandungan yang ada flavonoid merupakan senyawa polifenol yang banyak terkait dengan efek antioksidan dan kemoprotektif dan sitotoksik melalui mekanisme *cell cycle arrest*. Adanya senyawa non polar dapat mengakibatkan gangguan pada proses penarikan flavonoid karena tidak adanya proses *defatting*. Selain menyebabkan penurunan kadar senyawa lain yang dimungkinkan dapat menyebabkan penurunan aktivitas dari flavonoid. Kandungan senyawa yang memberikan efek sitotoksik pada tanaman buni juga sangat dipengaruhi dengan letaknya (organ). Berdasarkan penelitian kami yang terbaru menunjukkan aktivitas toksik tertinggi diberikan oleh kulit batang tanaman buni dengan metode BST.



Gambar 1. Morfologi sel HeLa (a) sel HeLa tanpa perlakuan setelah inkubasi 24 jam (b) pada perlakuan larutan uji setelah inkubasi 24 jam dengan pewarnaan Trypan Blue. Keterangan: I (sel hidup masih berbentuk daun), II sel hidup (bulat bersinar dan tidak berwarna), III sel mati berbentuk tidak beraturan dan berwarna biru.

Tabel 1. Hasil uji sitotoksisitas ekstrak metanol terhadap sel HeLa.

No	Kelompok ( $\mu\text{g/ml}$ )	Persen Kematian
1	kontrol sel	0,00
2	500,00	30,43
3	250,00	26,99
4	125,00	24,22
5	62,50	21,45
6	31,25	13,49
7	15,61	10,03
8	7,81	7,93
9	3,90	4,49

Buah buni banyak mengandung senyawa polifenol termasuk flavonoid dan terpenoid sedangkan kulit batang tanaman buni mengandung alkaloid dan flavonoid. Kandungan yang diperkirakan memiliki efek toksik pada buah buni adalah flavonoid dan alkaloid sehingga efek toksik yang diberikan kulit batang lebih tinggi dibandingkan buah.

Buah buni (*A. bunius* (L.) Spreng) berasal dari suku Euphorbiaceae. Beberapa penelitian melaporkan bahwa tumbuhan-tumbuhan dari famili euphorbiaceae memiliki aktivitas anti kanker, diantaranya adalah *Croton tonkinensis*, dan *Phyllanthus emblica*. Giang *et al* (2004) melaporkan bahwa ekstrak metanol daun *Croton tonkinensis* mengandung senyawa flavonoid vitexin dan isovitexin. Dua flavonoid tersebut memiliki aktivitas antioksidan yang berhubungan dengan mekanisme pencegahan kanker melalui penghambatan karsinogen. Choi

*et al* (2006), menyatakan bahwa vitexin mampu menghambat ekspresi *Hypoxia-inducible factors* (HIF)-1 $\alpha$ . HIF-1 $\alpha$  terekspresikan secara berlebih pada kondisi kanker, dan juga mempengaruhi gen-gen yang berhubungan dengan metastatis dan pertumbuhan tumor. Inhibitor HIF-1 $\alpha$  kemungkinan dapat digunakan untuk mengobati penyakit-penyakit yang diakibatkan oleh aktivasi yang berlebihan dari HIF-1 $\alpha$ , seperti tumor dan kanker. *Phyllanthus emblica* mengandung senyawa flavonoid kaemferol dan kuersetin (Summanen 1999). Menurut Sharma *et al* (2007), kaemferol dapat menginduksi apoptosis melalui mekanisme peningkatan tekanan oksidatif intraselular. Sedangkan kuersetin dapat menghambat enzim DNA topoisomerase sel kanker (Andreas *et al.* dalam Sukardiman *et al.* 1999). Enzim tersebut berperan dalam proses replikasi, transkripsi, rekombinasi DNA, dan

juga proliferasi serta diferensiasi sel kanker. Penghambatan enzim DNA topoisomerase dapat mengakibatkan kematian sel kanker (Sukardiman *et al.* 1999).

### KESIMPULAN

Ekstrak metanol buah buni kurang memiliki potensi sitotoksik terhadap sel HeLa dan tidak berkorelasi dengan hasil uji BST dikarenakan ekstraksinya tidak melalui tahap *defatting*.

### DAFTAR PUSTAKA

- Arland. 2006. Iptek Obat : Buni.
- Barton WD. 1996. *Advances in medicinal phytochemistry*. Moutroge france.
- Chen YC. 2004. Coumarolignans from the Root of Formosan *Antidesma pentandrum* vaar. *barbatum*. *Helvetica Chimica Acta*. **87** (11).
- Choi, Eun, Kim E, Kim Y, Jeon, Soh. 2006. Vitexin, an HIF-1 $\alpha$  Inhibitor Has Anti Metastatic Potential in PC12 Cells. *Moleculer and Cells* **22** (3): 291-299.
- Giang PM, Lee J, Son T. 2003. Flavonoid Glucosides from the Leaves of *Croton tonkinensis* Gagnep, Euphorbiaceae. *Journal of Chemistry* **42** (1): 125-128.
- Hoffman EJ. 1990. *Cancer and The Search for Selectives Biochemical Inhibitors*. CRC Press., London
- Katzung BG. 2001. *Farmakologi Dasar dan Klinik*, translated by Sjabana D. dkk from Basuc and Clinical Pharmacology, Jakarta.
- Maliya A. 2004. Perubahan Sel Menjadi Kanker Dilihat dari Sudut Pandang Biologi Molekuler. *Infokes* **8** (1). Maret-September 2004.
- Meiyanto E, Sismindari, Candra L, Moordiani. 2003. Efek Antiproliferatif ekstrak etanol daun dan batang tanaman cangkring (*Erythrina fusca* Lour) terhadap sel HeLa. *Majalah Farmasi Indonesia*. **14** (3)
- Micor JRL, Deocariz C & Mojica E. 2005. Biological Activity of Bignay (*Antidesma bunius* (L.) spreng) Crude Extract in *Artemia salina*. *Journal Medical Scientist* **5** (3): 195-198.
- Narod FB, Fakim AG & Subratty AH. 2004. Biological investigations into *Antidesma madagascariense* Lam. (Euphorbiaceae), *Faujasiopsis flexuosa* (Lam.) C. Jeffrey (Asteraceae), *Toddalia asiatica* (L.) Lam. and *Vepris lanceolata* (Lam.) G. Don (Rutaceae), *Journal of Cell and Molecular Biology* **3**: 15-21.
- Riyasa KT. 2001. *Hubungan Tingkat Depresi pada Penderita Kanker Mammae yang Menjalani Pengobatan dengan Operasi dan Kombinasi (Operasi dan Radioterapi)*. Ganesha Digital Library
- Rizvi SH, Shoeb A, Kapil R S & Popli SP. 2005. Antidesmanol-a new pentacyclic triterpenoid from *Antidesma menasu* Miq. ex. Tul. *Journal of Cellular and Molekuler Life Science* **36**.
- Sherma, J.; Fried, B.; 2003, Handbook of Thin Layer Chromatography third edition, New York
- Sukardiman, Santa IGP, Rahmadani S. 1999. Efek Antikanker Isolat Flavonoid dari Herba Benalu Mangga (*Dendrophtoe petandra*). Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Summanen, Olavi J. 1999. *A Chemical and Etnopharmacological Study on Phyllanthus emblica* (Euphorbiaceae). Academic Dissertation, University of Helsinki. Department of Pharmacy Division of Pharmacognosy. Helsinki.
- Tjindarbumi D & Mangunkusumo R. 2002. Cancer in Indonesia, Present and Future, Japanese *Journal of Clinical Oncology* **32**:S17-S2.
- Wahyuningsih, Mae SH, Mubarika S, Gandjar IG & Wahyuono S. 2003. Pencarian Senyawa Antikanker Dari Bahan Alam. *Majalah Obat Tradisional* **8** : 1
- Wijayakusuma MH, Dalimarta S & Wirian AS. 1996. *Tanaman Berkhasiat Obat di Indonesia Jilid IV*. Jakarta: Pustaka Kartini.