

EFEK SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL TANAMAN SARANG SEMUT (*Myrmecodia pendans* Merr & Perry) TERHADAP KARSINOMA KOLON PADA KULTUR SEL WiDr

Wandy Margo¹, Hana Ratnawati², Heddy Herdiman³

1. Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Maranatha, Bandung

2. Bagian Histologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Maranatha, Bandung

3. Bagian Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Maranatha, Bandung

Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha

Jl. Prof. Drg. Suria Sumantri MPH No. 65 Bandung 40164 Indonesia

ABSTRAK

Karsinoma kolon merupakan salah satu kanker saluran cerna yang umum terjadi dan menjadi penyebab utama morbiditas dan mortalitas akibat kanker di seluruh dunia. Prevalensi kanker kolon meningkat pada populasi dengan sosioekonomi menengah ke atas dan akibat faktor diet dan gaya hidup. Penatalaksanaan kanker kolon dengan kemoterapi dan radioterapi selain memerlukan biaya yang sangat banyak juga memiliki efek samping dan tingkat resistensi yang cukup tinggi. Pengobatan alternatif dengan menggunakan herbal dalam hal ini ekstrak etanol tanaman sarang semut sebagai obat antikanker diharapkan tidak memerlukan biaya yang banyak dan memiliki efek samping yang lebih minimal.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek sitotoksik ekstrak etanol tanaman sarang semut dan *Inhibitor Concentration 50* (IC₅₀) terhadap karsinoma kolon pada kultur sel WiDr.

Metode penelitian eksperimental sungguhan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan dilakukan perbandingan jumlah rerata sel kanker yang mati pada berbagai konsentrasi. Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan *One Way Anova* dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Test LSD* dan studi statistik analitik terhadap *Inhibitor Concentration 50* (IC₅₀).

Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi ekstrak etanol tanaman sarang semut yang bersifat toksik terhadap kultur sel WiDr adalah 10000 µg/ml, 5000 µg/ml, 2500 µg/ml, 1250 µg/ml, 625 µg/ml, 312,5 µg/ml, 156,25 µg/ml, 78,125 µg/ml, 39,0625 µg/ml, dan 19,531 µg/ml.

Simpulan ekstrak tanaman etanol sarang semut memiliki efek sitotoksik terhadap kultur sel WiDr dan memiliki dosis IC₅₀ sebesar 121,059 µg/ml.

Kata kunci : Karsinoma kolon, tanaman sarang semut, sel WiDr

ABSTRACT

Colon carcinoma is a cancer disease that generally attacks the gastrointestinal tract of the human and responsible for the main reason of morbidity and mortality caused by cancer in the world. The prevalence of the colon cancer rose among the middle-up social economy population which is probably caused by the diet and life style factor. The therapy for colon cancer which consists of chemotherapy and radiotherapy costs the patients a large sum of money and can bring side effects and the resistant level is fairly high. Alternative medication by herbs, in this case the ethanolic extract of sarang semut plant as the anticancer medicine, is hoped not to be too expensive and the side effects pushed to the minimal.

The purpose of this research is to find out the cytotoxicity effect of ethanolic extract of sarang semut plant and the Inhibitor Concentration 50 (IC₅₀) to colon carcinoma in WiDr cell culture.

Real experiment research method that uses the Completely Randomized Design (CRD) method and comparing the mean number of the dead cancer cell in various concentration. The data that was received, then needs to be analysed using One Way Anova, continued with Post Hoc Test LSD and analytic statistic study to Inhibitor Concentration 50 (IC50).

The research result showed the concentration from ethanolic extract of sarang semut plant which is toxic to WiDr cell culture is 10000 µg/ml, 5000 µg/ml, 2500 µg/ml, 1250 µg/ml, 625 µg/ml, 312,5 µg/ml, 156,25 µg/ml, 78,125 µg/ml, 39,0625 µg/ml, and 19,531 µg/ml.

The conclusion is the ethanolic extract of sarang semut plant consist of the cytotoxicity effect to WiDr cell culture with IC50 of 121,059 µg/ml.

Keyword : colon carcinoma, sarang semut plant, WiDr cell

PENDAHULUAN

Kanker adalah suatu massa yang abnormal dengan pertumbuhan yang tidak teratur (melampaui batas normal dan tidak terkoordinasi) dan dapat bermetastasis ⁽¹⁾. Kanker kolon merupakan keganasan pada saluran cerna yang paling umum dan menjadi penyebab utama morbiditas dan mortalitas di seluruh dunia ⁽²⁾. Kanker kolon menduduki peringkat ketiga penyebab kematian pada pria dan wanita di Amerika Serikat. Pada tahun 2009, ditemukan 106.100 kasus baru kanker kolon di Amerika. Kasus ini banyak terjadi pada afroamerika dan jarang terjadi pada anak-anak ⁽³⁾.

Di Indonesia jumlah penderita kanker kolorektal menempati urutan ke-10 setelah kanker lain. Pada hasil penelitian di RSUP Hasan Sadikin Bandung menunjukkan jumlah penderita kanker kolorektal meningkat setiap tahun dan ditemukan pada golongan usia antara 41-55 tahun ⁽⁴⁾. Sembilan koma lima persen dari total penderita kanker pada pria adalah kanker kolorektal, sedangkan pada wanita angkanya mencapai 9,3% dari total jumlah penderita kanker.

Salah satu tumbuhan herbal yang memiliki efek antikanker adalah sarang semut (*Myrmecodia*

pendans Merr & Perry). Tanaman sarang semut merupakan nama tumbuhan anggota famili Rubiaceae. Tanaman sarang semut mengandung tanin dan flavonoid. Mekanisme kerja flavonoid adalah menginaktivasi zat karsinogen, menghambat siklus sel, dan menginduksi apoptosis.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek sitotoksik penggunaan ekstrak etanol tanaman sarang semut sebagai antikanker pada kanker kolon. Pada penelitian ini akan dilakukan uji efek ekstrak etanol tanaman sarang semut terhadap kultur sel WiDr ⁽⁵⁾.

TUJUAN PENELITIAN

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah ekstrak etanol tanaman sarang semut memiliki efek sitotoksik terhadap sel-sel karsinoma kolon pada kultur sel WiDr dan mengetahui IC50 dari ekstrak etanol tanaman sarang semut dalam menghambat proliferasi dari kultur sel WiDr.

METODE

Metode penelitian yang digunakan adalah metode uji eksperimental sungguhan secara *in vitro* dengan RAL (Rancangan Acak Lengkap). Data yang diperoleh diuji dengan *One Way Anova* dan *Post Hoc*

Test LSD, dengan tingkat kepercayaan 95% dimana suatu perbedaan bermakna bila $p \leq 0,05$. Analisis data selanjutnya dengan studi analitik terhadap *Inhibitor Concentration 50*.

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian adalah kultur sel WiDr, ekstrak etanol tanaman sarang semut, 5-Fluorouracil, inkubator, *ELISA reader*, mikropipet, mikroskop, *microplate 96*, *culture flask*, *conical tube*, dan tabung *Eppendorf*.

Prosedur Perlakuan Percobaan

1. Flask berisi kultur sel yang sudah diinkubasi dikeluarkan dari inkubator CO₂, kemudian medium diganti dengan tripsin 0,25% diinkubasi kembali dalam inkubator selama 15 menit.
2. Dengan *inverted microscope* terlihat sel di dalam flask ikut bergerak lalu flask dibilas kembali dengan tripsin 0,25%.
3. Kultur sel dimasukkan ke dalam conical tube yang sudah terisi DMEM sebanyak 12 ml.
4. Kemudian disentrifugasi 2000 rpm selama 10 menit.
5. Supernatan dibuang, hitung sel dalam kamar hitung hemositometer dengan perbandingan 180 µl *tryptan blue* + 20 µl sel. Masukkan 10 µl dalam kamar hitung.
6. Tambahkan dalam conical tube yang berisi peller, media penumbuh hingga 12 ml.
7. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam sumur masing-masing 100 µl, plate diinkubasi selama 1-3 jam.

Uji Sitotoksik dengan *MTT assay*

1. Sebanyak 100 µl media DMEM yang mengandung suspensi sel

dengan kerapatan $\pm 2 \times 10^4$ sel/ml dimasukkan ke dalam *microplate 96*.

2. Ekstrak etanol tanaman sarang semut sebanyak 100 µl pada seri konsentrasi yang berbeda dimasukkan secara triplet menggunakan mikropipet.

3. Sel WiDr sebagai kontrol negatif dan media DMEM sebagai kontrol positif dimasukkan dalam sumuran.

4. Sel diinkubasi pada inkubator CO₂ selama 24 jam, suhu 37°C dengan kelembapan relatif 100% dan kadar CO₂ 5%.

5. Pada akhir masa inkubasi, MTT 5mg/ml ditambahkan pada masing-masing sumuran sebanyak 10 µl dan diinkubasi kembali selama 4 jam.

6. Setelah 4 jam reaksi dihentikan dengan penambahan 100 µl *Stop Solution* untuk melarutkan formazan.

7. Sel diinkubasi lagi selama 12 jam pada suhu 37°C dengan kelembapan relatif 100% dan kadar CO₂ 5%.

8. Hasil pengujian dibaca dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang (λ) 550nm.

9. Hasil pembacaan pada *ELISA reader* dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ kematian} = \frac{\sum OD \text{ kontrol} - \sum OD \text{ sampel}}{\sum OD \text{ kontrol}} \times 100\%$$

Keterangan : OD = *Optical Density*

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari penelitian yang dilakukan, diperoleh hasil :

Tabel 1 Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol Tanaman Sarang Semut Terhadap Sel WiDr

Perlakuan (µg/ml)	Rerata Sel Hidup	% Kematian
10000	0,217	84,64
5000	0,481	65,95

2500	0,466	67,02
1250	0,52	63,19
625	0,572	59,51
312,5	0,622	55,98
156,25	0,691	51,09
78,125	0,733	48,12
39,0625	0,797	43,59
19,531	0,801	43,31

Pada tabel 1 dapat dilihat bahwa persentase kematian tertinggi didapatkan pada pemberian ekstrak etanol tanaman sarang semut konsentrasi 10000 µg/ml dan terus menurun sesuai dengan turunnya konsentrasi hingga persentasi kematian terendah didapatkan pada pemberian ekstrak etanol tanaman sarang semut konsentrasi 19,531 µg/ml.

Tabel 2 Hasil One Way Anova Pengaruh Ekstrak Etanol Sarang Semut Terhadap Sel WiDr

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between groups	13618,67	10	1361,87	592,15	.000
Within groups	50,597	22	2,300		
Total	13669,27	32			

Dari hasil uji ANOVA (tabel 2) diperoleh $p=0,000$, berarti antar kelompok perlakuan terdapat perbedaan persentase kematian sel WiDr yang sangat signifikan.

Inhibitor Concentration 50 (IC50)

Penentuan konsentrasi ekstrak etanol tanaman sarang semut yang dapat menyebabkan persentase kematian 50% sel WiDr atau *Inhibitor Concentration 50 (IC50)*, maka

dilakukan perhitungan berdasarkan rumus *Reed and Muench* :

$$\text{Log IC50} = \log A - p \log 2$$

A = Dosis ekstrak yang menyebabkan kerusakan sel diatas 50 %

2 = Faktor pengenceran

$$P = \text{propionate distance} = \frac{a-50}{a-b}$$

a = jumlah sample (dalam %) yang mengalami kerusakan sel di atas 50%

b = jumlah sample (dalam %) yang mengalami kerusakan sel di bawah 50%

Perhitungan:

$$p = \frac{51,09-50}{51,09-48,12} = \frac{1,09}{2,97} = 0,367$$

$$\begin{aligned} \text{LogIC50} &= \log 156,25 - 0,367 \log 2 \\ &= 2,193 - (0,367 \times 0,301) \\ &= 2,083 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{IC50} &= 10^{2,083} \\ &= 121,059 \mu\text{g/ml} \end{aligned}$$

Tabel 3 Aktivitas Sitotoksik 5-Fluorourasil Terhadap Sel WiDr

Perlakuan (µg/ml)	Rerata Sel %	
	Hidup	Kematian
50	0,734	48,05
25	0,747	47,13
12,5	0,804	43,17
6,25	0,787	44,37
3,15	0,812	42,53
1,5625	0,823	41,75
0,781	0,837	40,76
0,391	0,839	40,62
0,195	0,82	41,96

Dosis 5-FU yang digunakan pada penelitian ini, berdasarkan optimasi dari peneliti dan berdasarkan penelitian yang terdahulu. Pada tabel 4.2 dapat dilihat bahwa persentase kematian tertinggi didapatkan pada

pemberian 5-Fluorourasil konsentrasi 50 µg/ml dan terus menurun sesuai dengan turunnya konsentrasi tetapi terdapat beberapa konsentrasi yang tidak menunjukkan hasil yang diharapkan. Hal ini tidak terlalu berpengaruh dan dalam penelitian sering terjadi hal tersebut. Persentasi kematian terendah didapatkan pada pemberian 5-Fluorourasil konsentrasi 0,391 µg/ml.

DISKUSI

Sel WiDr memiliki sensitivitas yang rendah terhadap perlakuan dengan 5-Fluorouracil (5-FU). 5-FU merupakan agen kemoterapi antimetabolit yang digunakan untuk terapi kanker kolon. Resistensi yang terjadi pada sel WiDr terhadap 5-FU karena terjadi peningkatan ekspresi timidilat sintetase yang merupakan target penghambatan utama dari 5-FU⁽⁶⁾.

Pada penelitian ini, kontrol positif dengan pemberian 5-Fluorourasil pada dosis 50µg/ml, memberikan persentase kematian sel sebanyak 48,05%, hampir setara dengan pemberian ekstrak etanol *tanaman* sarang semut pada dosis 78,125 µg/ml yang persentase kematiannya sebanyak 48,12%. Hal ini sesuai dengan penelitian dari Sigmond dan kawan-kawan mengenai resistensi sel WiDr terhadap 5-FU.

Pada dosis 10.000 µg/ml ekstrak etanol *tanaman* sarang semut, persentase kematian adalah 84,64% dengan demikian penulis menyimpulkan bahwa pemberian *tanaman* sarang semut cukup toksik dan tidak menutup kemungkinan dapat berefek toksik pada sel yang normal. Peneliti tidak mencari IC50 dari 5-

Fluorourasil karena dari hasil penelitian tidak ada satu pun dosis yang memberikan efek kematian sel WiDr sampai dengan 50%.

Menurut penelitian Paulina Yessica dan Wildan, ekstrak etanol *tanaman* sarang semut memiliki efek sitotoksik pada kultur sel MCF-7 dan sel SiHa⁽⁷⁾. Bila dibandingkan dengan penelitian uji sitotoksik ekstrak etanol *tanaman* sarang semut dan penentuan IC50 terhadap sel MCF-7 (dosis IC50 353,183 µg/ml) dan sel SiHa (dosis IC50 41,30 µg/ml), ekstrak etanol *tanaman* sarang semut memiliki dosis IC50 sebesar 121,059 µg/ml pada sel WiDr. Hal ini menunjukkan bahwa efektivitas ekstrak etanol *tanaman* sarang semut tidaklah sama pada setiap jenis sel. Selain itu, perlu dipertimbangkan ketika obat dikonsumsi oleh manusia, dalam hal ini ekstrak etanol *tanaman* sarang semut akan sangat dipengaruhi oleh faktor-faktor yang ada di dalam tubuh manusia sehingga dibutuhkan uji klinis sebelum ekstrak etanol *tanaman* sarang semut dapat digunakan sebagai obat alternatif terhadap kanker kolon.

Dosis IC50 di atas menunjukkan ekstrak etanol *tanaman* sarang semut memiliki efek sitotoksik yang lebih baik terhadap kultur sel WiDr dibandingkan pada kultur sel MCF-7. Pada tabel persentase kematian sel WiDr yang menggunakan ekstrak *tanaman* sarang semut dan 5-Fluorourasil menunjukkan hasil yang naik turun. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan dosis tidak selalu memberikan efek kematian sel yang lebih banyak dibandingkan dengan dosis yang lebih rendah.

SIMPULAN

Ekstrak etanol tanaman sarang semut berefek toksik terhadap karsinoma kolon pada kultur sel WiDr pada konsentrasi 10000 µg/ml, 5000 µg/ml, 2500 µg/ml, 1250 µg/ml, 625 µg/ml, 312,5 µg/ml, 156,25 µg/ml, 78,125 µg/ml, 39,0625 µg/ml, dan 19,531 µg/ml.

Nilai IC50 ekstrak etanol tanaman sarang semut pada kultur sel WiDr adalah 121,059 µg/ml.

SARAN

Perlu penelitian lebih lanjut mengenai efek ekstrak etanol tanaman sarang semut terhadap kanker kolon secara *in vivo* terhadap hewan coba.

Perlu penelitian uji toksisitas ekstrak etanol tanaman sarang semut terhadap sel epitel kolon normal.

Perlu penelitian untuk mencari senyawa aktif dalam sarang semut yang berpotensi sebagai antikanker.

DAFTAR PUSTAKA

1. Stricker, Thomas P and Kumar, Vinay. Neoplasia. [ed.] William Schmitt and Rebecca Gruliow. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 8th Edition. Philadelphia : Elsevier, 2010, pp. 260-330.
2. Turner, Jerrold R. The Gastrointestinal Tract. [book auth.] Vinar Kumar, et al., et al. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Philadelphia : Saunders Elsevier, 2010, Vol. VIII, pp. 763-831.
3. American Cancer Society, Inc., Surveillance and Health Policy Research. Estimated New Cancer Cases and Deaths by Sex, US, 2009. [Online] 2009. [Cited: April 26, 2013.] http://www.cancer.org/downloads/stt/CFF2009_EstCD_3.pdf
4. PROFIL PENDERITA KANKER KOLON DAN REKTUM DI RSUP HASAN SADIKIN BANDUNG. Sander, Mochamad Aleq. 2012.
5. WiDr is a derivative of another colon adenocarcinoma cell line, HT-29. Chen, TR, et al., et al. July 1987, Cancer Genet Cytogenet, pp. 125-34.
6. Induction of resistance to the multitargeted antifolate Pemetrexed (ALIMTA) in WiDr human colon cancer cells is associated with thymidylate synthase overexpression. Sigmond, Jennifer, et al., et al. 3, 2003, Biochemical Pharmacology, Vol. 66, pp. 431-438.
7. Uji Sitotoksitas Ekstrak Etanol Sarang Semut (*Myrmecodia pendens* Merr& Perry) terhadap Karsinoma Mammariae pada Kultur Sel MCF-7. Megaputri, Paulina Yessica P. 2012, p. 51.