

## SITOTOKSISITAS EKSTRAK ETANOLIK *CURCUMA LONGA* PADA SEL HeLa, STUDI *IN VITRO*

Chandra Kurniawan<sup>1</sup>, Jonathan Willy Siagian<sup>2</sup>, Suryani Hutomo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Duta Wacana

<sup>2</sup>Bagian Pathologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Duta Wacana

<sup>3</sup>Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Duta Wacana

Korespondensi: suryanihutomo\_drg@yahoo.com

### ABSTRAK

Kunyit (*Curcuma longa*) merupakan tanaman yang dapat tumbuh di daerah tropis dan sub tropis. Di Indonesia, kunyit menyebar secara merata di seluruh daerah. Kurkumin yang merupakan unsur utama kunyit. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa kunyit memiliki kandungan kurkumin yang terbukti secara klinis memiliki efek antioksidan, anti-inflamasi, antiproliferasi, dan sitotoksik sehingga mampu menginduksi apoptosis pada sel-sel keganasan darah, payudara, colon, sel hati, dan ovarium, dengan sensitivitas setiap sel terhadap kurkumin yang berbeda-beda.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengkaji efek sitotoksik ekstrak etanol *Curcuma longa* yang didapatkan dari daerah Bantul pada sel HeLa. Sel HeLa merupakan *cell line* yang telah dikultur dan dikembangkan dari sel epitelial kanker leher rahim yang digunakan untuk berbagai kepentingan penelitian. Sel HeLa ( $2 \times 10^4$  sel/well) dikultur dalam RPMI 1640 semalam sebelum stimulasi. Ekstrak etanol kunyit dengan berbagai konsentrasi ditambahkan pada kultur HeLa dan diinkubasi selama 24 jam dalam medium tanpa antibiotik. Analisis sitotoksitas dilakukan dengan menggunakan metode *MTT assay*. Doksorubisin ( $0,5625 \mu\text{g/ml}$ ) digunakan sebagai kontrol positif.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol *Curcuma longa* menyebabkan kematian sel sebesar 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) pada konsentrasi  $184,5 \mu\text{g/ml}$ .

Disimpulkan bahwa ekstrak etanol *Curcuma longa* bersifat sitotoksik pada sel HeLa, sehingga dapat dikembangkan agen kemopreventif.

**Kata Kunci:** ekstrak *Curcuma longa*, sel HeLa, sitotoksitas.

## CYTOTOXICITY ETHANOL EXTRACT CURCUMA LONGA IN CELLS HELA, STUDY IN VITRO

Chandra Kurniawan<sup>1</sup>, Jonathan Willy Siagian<sup>2</sup>, Suryani Hutomo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Medical Faculty of Duta Wacana Christian University

<sup>2</sup>Pathology Anatomy, Medical Faculty of Duta Wacana Christian University

<sup>3</sup>Microbiology Division, Medical Faculty of Duta Wacana Christian University

Correspondence: suryanihutomo\_drg@yahoo.com

### ABSTRACT

*Curcuma mostly found in areas with tropical and sub-tropical climate. In Indonesia, curcuma can be found in almost all regions and areas. Curcumin, which is curcuma's main constituent. Previous study reported that curcumin exhibit antioxidant, anti-inflammatory, anti-proliferation, and cytotoxicity effect, and inducing apoptoses in various cancer cells with different sensitivity.*

*The aim of this study is to evaluate the cytotoxicity of Curcuma longa extract against cervical cancer (HeLa) cell line in vitro. HeLa cells (2 x10<sup>4</sup> cells/well) were cultured in complete RPMI 1640 overnight before stimulation. Various concentration of Curcuma longa etanolic extract were added to the culture of HeLa cells and were incubated for 24 hours in antibiotic-free of culture medium. The cytotoxic activity was performed by using MTT assay. Doxorubicin (0,5625 µg/ml) was used as a positive control, and as negative control HeLa cell were grown without any treatment.*

*The results demonstrated that Curcuma longa extract exhibit cytotoxicity against HeLa cell line with IC<sub>50</sub> of 184,5 µg/ml. However, doxorubicin exhibit cytotoxicity against HeLa cell line with IC<sub>50</sub> of 0,90 µg/ml.*

*It means that Curcuma longa extract has lower cytotoxicity potential compared with doxorubicin.*

**Keywords:** *Curcuma longa extract, HeLa cells, apoptosis.*

## PENDAHULUAN

Kunyit (*Curcuma longa* / *tumeric*) merupakan tanaman yang dapat tumbuh di daerah tropis dan sub tropis mulai dari ketinggian 240-2000 meter di atas permukaan laut (dpl). Di Indonesia, kunyit menyebar secara merata di seluruh daerah. Tanaman ini tumbuh baik di tanah yang berpengairan baik dengan curah hujan sekitar 2.000 – 4.000 mm/tahunnya.<sup>1</sup> Kunyit termasuk tanaman obat, karena secara tradisional biasa digunakan untuk penyembuhan luka. Warna kuning kunyit berasal dari yang pigmen polifenol yang larut dalam lemak, yang dikenal dengan nama kurkuminoid. Kurkuminoid menyusun sekitar 2 – 9% dari kandungan kunyit. Beberapa kandungan kurkuminoid yang bisa ditemukan pada kunyit adalah kurkumin, demethoxykurkumin dan bisdemethoxykurkumin.<sup>2</sup> Kurkumin [(1E,6E) – 1,7-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenyl) hepta-1, 6-diene-3,5dione] merupakan pigmen kuning utama yang dihasilkan dari ekstrak kunyit, yang diambil dari rhizoma tanaman kunyit (*Curcuma longa*). Kurkumin mempunyai efek antioksidan, antiviral dan antifungal serta aksi anti inflamasi melalui penghambatan beberapa molekul penting yang berperan dalam inflamasi. Efek anti-inflamasi kunyit merupakan kombinasi dari 3 mekanisme, yaitu menurunkan produksi histamin, meningkatkan produksi dan memperpanjang daya kerja *cortisol* yang dihasilkan oleh kelenjar adrenal yang memiliki efek anti-inflamasi serta meningkatkan sirkulasi darah, sehingga mampu mengeluarkan toksin-toksin (*celular waste* dan *inflammatory compound*) yang sering terperangkap di dalam sendi-sendi kecil.<sup>3</sup>

Beberapa penelitian melaporkan bahwa kurkumin mampu menghambat pertumbuhan beberapa

tipe sel kanker. Mekanisme kurkumin menginduksi apoptosis diduga melalui penghambatan beberapa *cell-signaling pathway*. Target-targetnya antara lain *transcription factor*, *oncogens*, dan *signaling protein*. Kurkumin berperan dalam kontrol siklus sel dan stimulasi apoptosis melalui regulasi p16 dan p53.<sup>4</sup> Tujuan penelitian ini adalah untuk mengkaji efek sitotoksik ekstrak etanol *Curcuma longa* pada sel HeLa.

## METODE PENELITIAN

### 1. Ekstraksi *Curcuma longa*

Kunyit didapatkan dari daerah Bantul, Yogyakarta. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi. Metode ini dilakukan dengan cara serbuk kunyit (simplisia) yang didapatkan dari rimpang kunyit usia 9 bulan, dimasukkan ke dalam wadah, setelah itu ditambahkan pelarut etanol dengan perbandingan 10 : 1. Simplisia direndam selama 24 jam dengan melakukan pengadukan secara berkala, setelah itu dilakukan penampungan filtrat. Ampas yang didapatkan dari penyaringan kemudian direndam kembali dengan menggunakan etanol 96%. Prosedur ini dilakukan sebanyak 3 kali. Setelah filtrat didapatkan maka dilakukan evaporasi dengan menggunakan evaporator hingga dihasilkan ekstrak semi padat etanol rimpang kunyit. Ekstrak kemudian keringkan dalam oven bersuhu 40 ° C.

### 2. Kultur Sel HeLa

Sel HeLa ditumbuhkan dalam medium RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) yang disuplementasi dengan 10% FBS, 100 IU/ml penisilin, 10 µg/ml streptomisin dalam suhu 37°C dengan kadar CO<sub>2</sub> 5%. Flask yang berisi sel diinkubasi untuk mendapatkan sejumlah sel yang dibutuhkan (konfluen). Sel HeLa dipanen dengan cara menambahkan 1-2 ml tripsin 0,25% ke dalam flask

dan ditunggu beberapa saat. Sel HeLa kemudian dipindahkan ke *conical tube* dan ditambahkan medium RPMI hingga volume 10 ml kemudian disentrifuge selama 5 menit dengan kecepatan 2000 rpm.

Supernatan kemudian dibuang, pelet diresuspensi dalam 1 ml medium dan dihitung jumlahnya menggunakan bilik hitung. Suspensi sel dipindahkan pada *96 well-plate*, ditambahkan sejumlah medium hingga memperoleh konsentrasi sel sebesar  $2 \times 10^4$  sel/10  $\mu$ l dan siap digunakan.

### 3. MTT Assay

Suspensi sel kanker serviks (HeLa) sebanyak 100  $\mu$ L dengan kepadatan  $2 \times 10^4$  sel/100  $\mu$ L didistribusikan ke dalam sumuran-sumuran pada *96-well plate* dan diinkubasi 3 jam. Ke dalam sumuran dimasukkan 100  $\mu$ L larutan ekstrak kunyit dengan seri konsentrasi sebagai berikut: 12,5  $\mu$ g/ml, 25  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml, dan 200  $\mu$ g/ml, dengan 3 replikasi untuk masing masing kelompok. Sel diinkubasi *overnight* dalam inkubator dengan aliran 5% CO<sub>2</sub>. Pada akhir inkubasi, media kultur dibuang lalu ditambahkan 10  $\mu$ L larutan MTT (5 mg/mL PBS), dan medium diganti dengan 190  $\mu$ L medium RPMI 1640 komplit. Sel kemudian diinkubasi

selama 3-4 jam. Reaksi MTT dihentikan dengan penambahan reagen *stopper* SDS (100  $\mu$ L). *Microplate* kemudian dibungkus dengan tissue dan diinkubasi selama 1 malam pada suhu kamar dan ruangan gelap. Sel yang hidup akan mereduksi MTT membentuk kristal formazan yang berwarna ungu. Hasil pengujian dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm.

### ANALISIS

Untuk menentukan ada tidaknya hubungan antara konsentrasi ekstrak *Curcuma longa* dan persentase kematian sel digunakan regresi linear pada Microsoft Excel guna mencari persamaan kurva dosis respon dan dilakukan perhitungan nilai IC<sub>50</sub>.

### HASIL PENELITIAN

Hasil pengukuran nilai absorbansi supernatan menggunakan *spektrofotometer* (Bio-Rad Laboratories) mengindikasikan bahwa persentase kematian sel HeLa terus meningkat sebanding dengan kenaikan konsentrasi ekstrak yang diberikan. Kematian sel terbesar terdapat pada pemberian konsentrasi ekstrak 200  $\mu$ g/ml yaitu sebesar 51,873% (Tabel 1).

Tabel 1. Persentase Kematian Sel HeLa

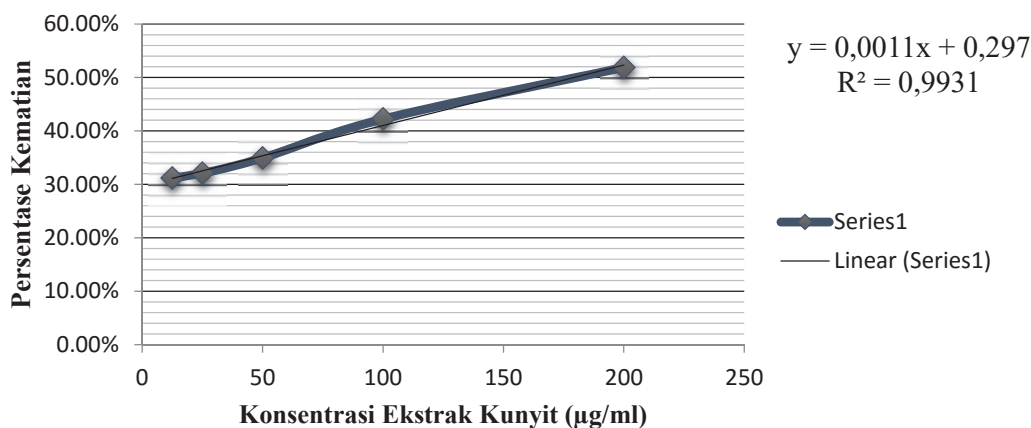
Konsentrasi ekstrak ( $\mu$ g/ml)	Persentase kematian sel HeLa
200	51,873%
100	42,233%
50	34,940%
25	32,093%
12,5	31,194%

Berdasarkan hasil di atas, dibuat grafik regresi linear menggunakan Microsoft Excel, dan didapatkan persamaan  $y = 0,0011x + 0,2912$ ; dimana  $y$  merupakan persentase kematian sel HeLa, dan  $x$

merupakan konsentrasi ekstrak kunyit. Dari persamaan tersebut dilakukan perhitungan untuk mengetahui nilai IC<sub>50</sub> ekstrak kunyit. Untuk perhitungan nilai IC<sub>50</sub>, maka harga  $y$  diganti menjadi 0,5; sehingga

didapatkan nilai IC 50 sebesar 184,5 yang artinya ekstrak etanol kunyit menyebabkan kematian separuh jumlah sel HeLa pada konsentrasi

184,5 µg/ml. Hasil pada Tabel 1 dipresentasikan dalam bentuk grafik pada Gambar 1.



Gambar 1. grafik persentase kematian sel HeLa

## DISKUSI

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kunyit dengan konsentrasi 184,5 µg/ml mampu mematikan 50% sel HeLa. Hasil ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Anggraini (2007) yang menguji ekstrak rimpang *Curcuma longa* terhadap sel kanker payudara T47D, didapatkan harga IC<sub>50</sub> = 100 µg/ml.<sup>5</sup> Perbedaan sensitivitas terhadap paparan ekstrak yang seringkali dijumpai dalam penelitian bisa terjadi karena beberapa faktor, seperti kadar kurkumin yang terkandung di dalam ekstrak, jenis ekstrak, dan perbedaan *cell line* yang dipakai, sehingga setiap sel bisa memberikan respons yang berbeda-beda terhadap paparan ekstrak.<sup>6</sup>

Kurkumin yang terkandung dalam ekstrak kunyit terbukti memiliki kemampuan untuk menginduksi penahanan siklus sel (*cell cycle arrest*) dan menginduksi apoptosis. Mekanisme kurkumin menginduksi apoptosis sangat bervariasi, dan diduga menginhibisi beberapa *cell-signaling pathway*.

Menurut Wilken (2011), efek antikanker curcumin melalui mekanisme sebagai berikut; pertama curcumin mensupresi aktivasi NF-κB melalui inhibisi aktivitas IκKB sehingga mengakibatkan supresi gen yang berperan dalam tumorigenesis seperti TNF, COX-2, cyclin D1, c-myc, MMP-9 and interleukins.<sup>4</sup> Kedua Curcumin berperan dalam pengontrolan siklus sel dan stimulasi apoptosis melalui regulasi p16 dan p53, dan ketiga curcumin merupakan modulator *autophagy* dan mempunyai efek inhibisi terhadap angiogenesis tumor dan inhibisi metastasis melalui supresi berbagai *growth factor* termasuk VEGF, COX-2, MMPs and ICAMs.

Studi yang dilakukan oleh Wang Y, tahun 1995 membuktikan bahwa kurkumin mampu menginduksi apoptosis sel tumor pada fase G2 melalui regulasi ekspresi p53 dan menginisiasi jalur apoptosis mitokondria melalui peningkatan ekspresi Bax dan pelepasan sitokrom C<sup>7</sup>. Kurkumin juga memiliki efek stimulasi jalur apoptosis ekstrinsik, yang dipicu dengan ikatan “death

*activator*” seperti TNF alfa dan Fas Ligand yang masing-masing akan berikatan dengan reseptor-reseptornya yang terdapat pada permukaan sel. Aktivasi reseptor tersebut mengakibatkan aktivasi caspase-8 melalui *receptor-attached FADD adapter molecule* dan inisiasi kaskade caspase. Curcumin menunjukkan mempunyai efek meningkatkan level Fas dan FADD dan menginduksi apoptosis pada *mouse-rat retinal ganglion cell*.

Curcumin menyebabkan meningkatnya regulasi ekspresi famili Cip/Kip yang menghambat CDK (p21 Cip1/Waf1, p27 Kip1, p57 Kip2), sehingga menghambat pembentukan kompleks cyclin D1 dengan CDK4,6. Selain itu, curcumin juga mengurangi fosforilasi Rb, dan mensupresi E2F-regulated gene.<sup>8</sup>

Ketidakteraturan kontrol siklus sel dapat mengakibatkan pembentukan sel tumor, dimana terjadi proliferasi dan pertumbuhan sel yang tidak terbatas. Contohnya pada overekspresi cyclin D1 terdapat pada banyak sel kanker, seperti pada keganasan darah. Curcumin berefek mensupresi cyclin D1 pada beberapa tipe kanker, seperti pada kanker kepala dan leher, kanker kolon, kanker serviks, kanker payudara, kanker pankreas, sebagai efek inhibisi dari aktivasi NF- $\kappa$ B.<sup>9</sup>

Penelitian lain yang dilakukan oleh Mohammad *et al.*, (2010) menggunakan ekstrak yang sama terhadap pada *cell line* kanker paru A549 selama 24 jam, menunjukkan nilai IC50 = 0,23  $\mu$ g/ml. Dari beberapa hasil penelitian diatas, bisa terlihat bahwa nilai IC50 ekstrak *Curcuma longa* yang dipaparkan terhadap sel HeLa memerlukan konsentrasi yang jauh lebih tinggi bila dibandingkan dengan *cell line* yang lain.<sup>10</sup> Studi lain oleh Maksun (2010) yang menggunakan ekstrak *Curcuma zedoaria* (temu putih) pada sel HeLa mendapatkan nilai IC50 = 58,9

$\mu$ g/ml.<sup>11</sup> Jika dibandingkan dengan harga IC50 *Curcuma longa*, maka efek sitotoksik ekstrak *Curcuma zedoaria* lebih besar jika dipaparkan pada sel HeLa.

National Cancer Institute (NCI) menetapkan kriteria bagi ekstrak bahan alam yang akan dikembangkan sebagai obat antikanker. Ekstrak bahan alam dengan nilai IC50 < 30  $\mu$ g/ml dianggap mempunyai efek sitotoksitas yang potensial, dan dilanjutkan untuk diuji lebih lanjut dengan *cell line* yang lain secara *in vitro*.<sup>12</sup> Berdasarkan kriteria tersebut, ekstrak kunyit (*Curcuma longa*) tidak direkomendasikan untuk diteliti lebih lanjut sebagai obat anti kanker, tetapi bisa dikembangkan sebagai agen kemoprevensi. Studi epidemiologi oleh Mohandas (1999) menunjukkan bahwa angka kejadian kanker kolon di India yang rendah dihubungkan dengan aktivitas kemoprevensi dan antioksidan curcumin yang sangat banyak dikonsumsi sebagai bumbu pada makanan.

## KESIMPULAN

Ekstrak etanol kunyit bersifat toksik pada sel HeLa dan menyebabkan kematian sebesar separuh dari jumlah sel HeLa pada konsentrasi 184,5  $\mu$ g/ml.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Syukur, C dan Hernani. *Budi Daya Tanaman Obat Komersial*. Jakarta : Penebar Swadaya. 2001 Hlm :76-77.
2. Nayak, P.L. Curcumin : a wonder anticancer drug. *Int J Phram Biomed*, 2012 : 60-69.
3. Akram M. Curcuma longa and curcumin. *J Biol. – Plant Biol.*, 2010 (55):65- 70.
4. Wilken Reason. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular cancer*.

2011. (diakses dari: <http://www.molecular-cancer.com/content/10/1/12>).
5. Anggraini, Polis Novita. Aktivitas Campuran Ekstrak Etanol Herba Sambiloto dan Rimpang Kunyit terhadap Sel Kanker Payudara Manusia T47D *in vitro* dengan Metode MTT. Skripsi Universitas Airlangga, Surabaya 2007.
  6. Prayong P, Barusrux S, Weerapreeyakul N. Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. *Fitoterapia*, 2008. 79:598-601.
  7. Wang Y, Okan I, Szekely L, Klein G, Wiman KG. (1995) Bcl-2 inhibits wild-type p53- triggered apoptosis but not G1 cell cycle arrest and transactivation of WAF1 and Bax. *Cell Growth Differ*, 6:1071-1075.
  8. Mukhopadhyay A, Banerjee S, Stafford LJ, Xia C, Liu M, Aggarwal BB. Curcumin-induced suppression of cell proliferation correlates with down-regulation of cyclin D1 expression and CDK4-mediated retinoblastoma protein phosphorylation. *Cell Cycle*, 2007. 6:2953-2961.
  9. Liu Q, Loo WT, Sze SC, Tong Y. Curcumin inhibits cell proliferation of MDA-MB-231 and BT-483 breast cancer cells mediated by downregulation of NFkappaB, cyclinD and MMP-1 transcription. *Phytomedicine*, 2009. 16:916-922.
  10. Maksun Radji, *et al.* Uji Sitotoksitas Buah Merah, Mahkota Dewa, dan Temu Putih terhadap sel kanker serviks. *Jurnal Farmasi Indonesia* Vol. 5 No.1 Januari 2010 hal. 41-47.
  11. Itharat A., B. Ooraikul. Research on Thai medicinal plants for cancer treatment. *Advances in Medicinal Plant Research*. 2007.
  12. Mohandas KM, Desai DC. Epidemiology of digestive tract cancers in India : Large and small bowel. *Indian J Gastroenterol*, 1999. 18:118-121.

