

**PENGARUH EKSTRAK DAUN MIMBA (*Azadirachta indica*) TERHADAP  
PERTUMBUHAN SEL HELA  
PENELITIAN *IN VITRO* PADA SEL HELA KANKER SERVIKS**

**THE EFFECT OF NEEM LEAF EXTRACT (*AZADIRACHTA INDICA*) ON  
THE GROWTH OF HELA CELL**

Siti Masithoh<sup>1</sup>, Erna Mirani<sup>2</sup>, Titiek Sumarawati<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung (Unissula) Semarang

<sup>2</sup>Bagian Ilmu BioKimia Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung (UNISSULA) Semarang

<sup>3</sup>Bagian Kimia Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung (UNISSULA) Semarang

**ABSTRAK**

Sel HeLa merupakan sel kanker serviks yang dapat bermetastasis dengan cepat. Daun mimba yang mengandung limonoid dan polisakarida merupakan tanaman multifungsi yang dapat digunakan sebagai antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun Mimba (*Azadirachta indica*) terhadap sel HeLa (sel kanker serviks) khususnya pada  $LC_{50}$ . Penelitian eksperimental dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design* ini menggunakan  $1,08 \times 10^6$  sel HeLa, dibagi dalam 12 kelompok yang dimasukkan ke dalam sumuran dengan pemberian konsentrasi ekstrak daun mimba 1  $\mu$ l/ml, 2,5  $\mu$ l/ml, 5  $\mu$ l/ml, 10  $\mu$ l/ml, 25  $\mu$ l/ml, 50  $\mu$ l/ml, 100  $\mu$ l/ml, 250  $\mu$ l/ml, 500  $\mu$ l/ml dan 1000  $\mu$ l/ml, menggunakan kontrol dokсорubisin dan sel. Pengaruh efek sitotoksik berupa kematian sel diamati dengan metode *direct counting* dengan pewarnaan tryphan blue. Hasil rerata efek sitotoksik tertinggi terdapat pada kelompok 1000  $\mu$ l/ml (87,50 %), sedangkan rerata terendah terletak pada kelompok 1  $\mu$ l/ml (39,17 %). Hasil uji *kruskal walis* didapatkan perbedaan bermakna dengan  $p = 0,008$ . Hasil analisis *Mann Whitney* menunjukkan tidak adanya perbedaan bermakna diantara tiap konsentrasi ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*) maupun pada kelompok kontrol ( $p > 0,05$ ). Analisis efek sitotoksik menggunakan probit pada  $LC_{50}$  terletak pada konsentrasi 8.23027  $\mu$ l/ml. Dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*) mempunyai pengaruh terhadap sel hela dengan dosis minimum 8.23  $\mu$ l/ml.

**Kata kunci:** daun mimba, efek sitotoksik, kanker serviks, sel hela

**ABSTRACT**

*HeLa cells are the cervical cancer cells that can metastasize rapidly. Neem leaf is a multifunctional plant that can be used as anticancer. This study aims at finding out the effect of neem leaf extract (*Azadirachta indica*) against HeLa cells, especially in  $LC_{50}$ . In this experimental study using post test only control group design,  $1.08 \times 10^6$  HeLa cells were divided into 12 groups which were entered into the wells with neem leaf extract at the concentrations of 1  $\mu$ L/mL, 2.5  $\mu$ L/mL, 5  $\mu$ L/mL, 10  $\mu$ L/mL, 25  $\mu$ L/mL, 50  $\mu$ L/mL, 100  $\mu$ L/mL, 250  $\mu$ L/mL, 500  $\mu$ L/mL and 1000  $\mu$ L/mL, using doxorubicin and cell control. The effect of cytotoxic effects indicated by the death cell was observed by direct counting method with tryphan blue staining. The highest and the lowest mean of cytotoxic effect was recorded for 1000  $\mu$ L/mL group (87.50%) and 1  $\mu$ L/mL group (39.17%). Kruskal Wallis test resulted in a significant difference among 12 groups with  $p = 0.008$ . The Mann Whitney test showed a non-significant difference among the groups between the concentrations of neem leaf extract (*Azadirachta indica*) and the control group ( $p > 0.05$ ). The probit analysis for cytotoxic effects showed that  $LC_{50}$  was at 8.23027  $\mu$ L/mL in concentration. In conclusion, the extract of neem leaves (*Azadirachta indica*) has an effect on HeLa cells with a 8.23  $\mu$ L/mL in minimum dose.*

**Keywords:** cervical cancer, cell hela cells, cytotoxic effect, neem leaves

## PENDAHULUAN

Sel hela merupakan sel kanker serviks yang telah diisolasi. Sel ini berawal dari sel serviks normal yang cepat tumbuh dan akhirnya mengalami hiperplasi (Goodwin dan DiMaio, 2000). Pengobatan konvensional yang umum dilakukan pada penyakit kanker antara lain dengan pembedahan, kemoterapi dan radioterapi (Apantaku 2002). Namun, terapi tersebut belum bisa mengobati secara maksimal khususnya pada sel kanker yang telah menyebar (metastasis) bahkan dapat menimbulkan efek samping (Kintoko *et al.*, 2008). Mimba (*Azadirachta indica*) merupakan tanaman multifungsi yang kaya dengan kandungan kimia dan sering digunakan untuk mengobati beberapa penyakit sehingga pada saat ini banyak penelitian yang menunjukkan bahwa tanaman mimba dapat digunakan sebagai obat antikanker (Hatmanani, 2010).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya pengaruh ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*) terhadap sel HeLa (Sel kanker servik). Manfaat penelitian ini. Memberi masukan dan informasi ilmiah tentang zat-zat yang terkandung dalam daun mimba (*Azadirachta indica*) dan efek sitotoksik yang timbul, sebagai bahan rujukan untuk penelitian lebih lanjut dan untuk menambahkan pengetahuan serta memanfaatkan daun mimba (*Azadirachta indica*) sebagai zat anti kanker khususnya kanker serviks yang aman bagi kesehatan.

## BAHAN DAN CARA PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan penelitian *Post Test Only Control Group Design*. Ekstrak daun mimba didapat dari larutan kental yang diperoleh dari pengambilan ekstraksi daun mimba dengan menggunakan pelarut etanol 90% diberikan dengan dosis konsentrasi 1 µl/ml, 2,5 µl/ml, 5 µl/ml, 10 µl/ml, 25 µl/ml, 50 µl/ml, 100 µl/ml, 250 µl/ml, 500 µl/ml dan 1000 µl/ml al. Efek Sitotoksik diperoleh dari efek yang ditimbulkan pada sel hela setelah pemberian ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*) dan diuji *in vitro* dengan menggunakan kultur sel yang digunakan untuk mendeteksi adanya aktivitas antineoplastik dari suatu senyawa. Sistem ini merupakan uji kuantitatif dengan menghitung kematian sel secara langsung menggunakan *haemocytometer*.

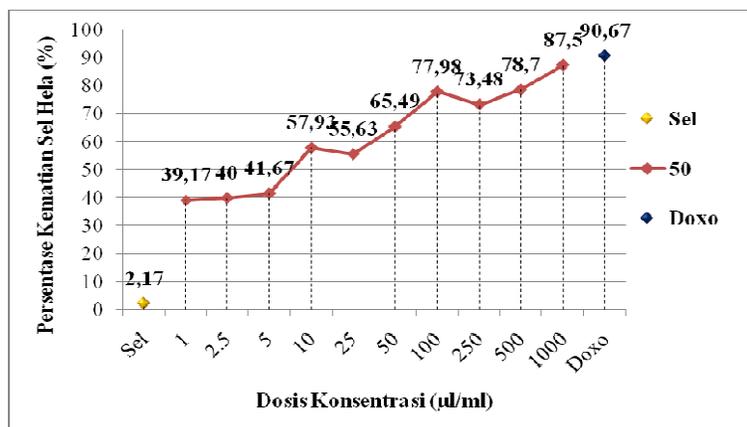
Penelitian dilakukan dengan cara membagi sampel menjadi 12 kelompok uji yang masing-masing diisi dengan 100 µl kultur sel HeLa dengan kepadatan  $3 \times 10^4$  sel tiap

sumuran, selanjutnya tiap sumuran diberi ekstrak daun mimba konsentrasi 1 µl/ml, 2,5 µl/ml, 5 µl/ml, 10 µl/ml, 25 µl/ml, 50 µl/ml, 100 µl/ml, 250 µl/ml, 500 µl/ml dan 1000 µl/ml, kontrol doksorubisin dan sel. Keduabelas kelompok uji tersebut dilakukan pengulangan masing-masing sebanyak tiga kali. Kemudian kematian sel hela dihitung secara langsung menggunakan *haemocytometer*. Penelitian ini dilakukan di laboratorium Biologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Data kematian sel hela yang diperoleh diolah menggunakan program SPSS. Data tersebut di uji normalitas dan homogenitas dengan *Shapiro-Wilk test* dan *Levene test*, karena data tidak normal dan homogen dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis Test* untuk membandingkan data lebih dari dua sampel yang dilanjutkan dengan uji parametrik *Mann-Whitney test* untuk menguji perbedaan antara kelompok satu dengan kelompok lain. Efek sitotoksitas diperoleh dari total jumlah sel hidup 100% dan persentase kematian sel (%) dari tiap konsentrasi dosis uji. Analisis statistik menggunakan regresi probit (Dahlan, 2006).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengukuran rerata persentase efek sitotoksik ekstrak daun mimba terhadap sel hela disajikan pada **Gambar 1**. Hasil uji *kruskal walis* menunjukkan bahwa angka kematian sel pada tiap perlakuan dengan zat yang sama berbeda secara signifikan ( $p < 0,05$ ). Hasil uji *Mann Whitney* menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna diantara tiap konsentrasi ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*) dan kelompok kontrol doksorubisin ( $p > 0,05$ ). Nilai  $LC_{50}$  hasil analisis regresi probit sebesar 8,23027 yaitu pada konsentrasi 8.23027 µl/ml, sehingga terdapat pengaruh ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*) terhadap sel hela.



**Gambar 1. Grafik rerata efek sitotoksik ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*) terhadap sel HeLa**

Efek sitotoksik ekstrak daun mimba disebabkan kandungan polisakarida dan limonoid yang berpengaruh menghambat aktivitas proliferasi dari sel HeL. Senyawa-senyawa kimia yang berasal dari alam atau tumbuhan khususnya polisakarida dan limonoid memiliki daya untuk meningkatkan dan menyeimbangkan aktivitas dari semua kelas sel-sel imun sehingga pertahanan tubuh terhadap kanker meningkat dan akhirnya dapat mempercepat *apoptosis* (Agrawal, 2004).

Kematian sel hela ditandai dengan berubahnya sel menjadi warna biru setelah diwarnai dengan pewarnaan triplan blue. Hal tersebut dapat terjadi karena sel yang mati memiliki membran yang rusak sehingga dapat menyerap warna biru dari tryplan blue tersebut. Pemberian senyawa-senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak mimba (*Azadirachta indica*) merupakan salah satu faktor penyebab rusaknya membran sel HeLa yang nantinya akan diikuti dengan matinya sel tersebut (Lieberman, 2001).

Menurut Iradjajanegara dan Priyo Wahyudi (2010), kecenderungan semakin tinggi konsentrasi ekstrak ceplukan (*Physalis angulata*) semakin banyak kandungan senyawa yang terdapat pada ekstrak tersebut sehingga semakin tinggi pula efek sitotoksik terhadap sel tersebut. Akan tetapi, dalam penelitian ini perbedaan konsentrasi tidak begitu mempengaruhi kadar sitotoksiknya. Hal ini bisa dikarenakan adanya pengenceran dosis yang tidak sesuai. Masa hidup atau umur dari sel juga menentukan adanya pengaruh sitotoksik. Walaupun kadar konsentrasinya rendah, sel hela yang sudah waktunya apoptosis juga akan lebih mudah mati. Menurut Priyanto (2007), penyebab perbedaan kadar sitotoksik disebabkan karena adanya faktor *biochemical uncoupling* yaitu zat - zat yang terkandung didalam ekstrak akan mempengaruhi sintesis molekul ATP tanpa mempengaruhi *transfor electron* (normal) dapat menyebabkan *liberasi energy* sehingga menghasilkan panas. Peningkatan dosis konsentrasi, juga akan meningkatkan jumlah zat yang terkandung didalamnya, efek *biochemical uncoupling* pun juga semakin banyak sehingga efek toksiknya juga akan semakin besar.

Berdasarkan hasil analisis efek sitotoksik dengan metode *direct counting haemocytometer* yang telah dilakukan dapat diketahui bahwa kelompok doksorubicin memiliki efek sitotoksik tertinggi diikuti dengan kelompok konsentrasi ekstrak, hal tersebut dikarenakan doksorubicin sudah mempunyai komponen senyawa yang utuh

untuk membunuh sel hela, sedangkan kelompok ekstrak masih mempunyai beberapa senyawa lain yang kemungkinan menghambat efek sitotoksik selain polisakarida dan limonoid.

Setiap konsentrasi ekstrak tidak memiliki perbedaan yang bermakna terhadap jumlah sel Hela yang mati, dikarenakan pada konsentrasi berapapun ekstrak tersebut sudah berefek sitotoksik terhadap sel HeLa, sehingga ekstrak tersebut dapat digunakan dengan berbagai macam dosis, namun paling optimal menggunakan kelompok konsentrasi 1000  $\mu\text{l/ml}$ . Kelompok konsentrasi 1000  $\mu\text{l/ml}$  (100%) dan kelompok kontrol positif doksorubicin masih didapatkan sel HeLa yang masih hidup padahal pada kelompok tersebut sudah memiliki konsentrasi yang pekat, ini menunjukkan bahwa sel HeLa merupakan sel yang kuat yang dapat mempertahankan hidup walau tanpa adanya media kultur selama 24 -72 jam. Kemudian, pada kelompok sel masih didapatkan sel HeLa yang mati. Hal ini juga dapat menunjukkan bahwa sel tersebut akan terhambat kerjanya bila tidak dalam media kultur yang sesuai atau tidak ada media kultur.

Analisis  $LC_{50}$  didapatkan pada dosis kelompok konsentrasi yaitu pada konsentrasi 8.23027  $\mu\text{l/ml}$ . Ini menunjukkan bahwa dengan dosis konsentrasi tersebut sel HeLa sudah dapat dimatikan. Bila diberikan dosis kurang dari 8.23027  $\mu\text{l/ml}$  maka sel HeLa akan menjadi resisten terhadap pengobatan (Vincent, 2007).

Analisis probit pada LC 1- LC 6 menunjukkan bahwa dengan pemberian dosis konsentrasi ekstrak kurang dari 0,01  $\mu\text{l/ml}$  sel hela dapat mati, hal ini dapat disebabkan karena adanya faktor umur dan gizi dari sel HeLa karena pada faktor lainnya, misalnya spesies, lingkungan dan jalur pemberian dilakukan perlakuan dan plate yang sama dalam inkubator. Selain faktor tersebut, terbentuknya ikatan kovalen juga merupakan faktor kematian sel HeLa. Karena dengan terbentuknya ikatan tersebut terbentuk zat elektrofilik reaktif yang akan mempengaruhi senyawa pada ekstrak daun mimba (*Azadiracta indica*) karena itulah perlu adanya penelitian lebih lanjut dengan pemisahan senyawa limonoid dan polisakarida terlebih dahulu (Priyanto, 2007).

## KESIMPULAN

Terdapat perbedaan pengaruh dan efek sitotoksik ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*) terhadap sel hela pada konsentrasi 1  $\mu\text{l/ml}$ , 2,5  $\mu\text{l/ml}$ , 5  $\mu\text{l/ml}$ , 10  $\mu\text{l/ml}$ , 25  $\mu\text{l/ml}$ , 50  $\mu\text{l/ml}$ , 100  $\mu\text{l/ml}$ , 250  $\mu\text{l/ml}$ , 500  $\mu\text{l/ml}$  dan 1000  $\mu\text{l/ml}$ . Efek

sitotoksik tertinggi terdapat pada kelompok 1000  $\mu\text{l/ml}$  (87,50%), kemudian kelompok 500  $\mu\text{l/ml}$  (78,70%), kelompok 100  $\mu\text{l/ml}$  (77,98%) dan kelompok 250  $\mu\text{l/ml}$  (73,48%), selanjutnya diikuti dengan kelompok 50  $\mu\text{l/ml}$  (62,83%), kelompok 10  $\mu\text{l/ml}$  (65,49%), kelompok 25  $\mu\text{l/ml}$  (55,63%), kelompok 5  $\mu\text{l/ml}$  (41,67%), kelompok 2,5  $\mu\text{l/ml}$  (40,00%) dan kelompok 1  $\mu\text{l/ml}$  (39,17%).  $LC_{50}$  di temukan pada konsentrasi 8.23027  $\mu\text{l/ml}$  yaitu dengan nilai regresi probit 8.23027.

## SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pemisahan senyawa polisakarida dan limonoid pada ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*) dengan senyawa lain, mengadakan pelatihan terlebih dahulu terhadap peneliti, dan efek sitotoksik ekstrak tumbuhan lain yang lebih efektif menghambat pertumbuhan sel hela serta efek sitotoksik ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*) terhadap sel hela secara *in vivo*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agrawal, D. P. 2004. Medicinal properties of Neem: New Findings. *Current Science : USA*. VOL. 82, NO. 11, 10 JUNE 2002 : 1336-1345.
- Apantaku, L.M. 2002. Breast-conseving surgery for breast cancer. *Am. Fam. Physician* **66**(12): 2271-2278.
- Dahlan, M. Sopiudin. 2006. Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan (edisi 4). Salemba Medika : Jakarta.
- Goodwin, E.C., DiMaio, D. 2000. Repression of human papillomavirus oncogenes in Hela cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Biochemistry Journal*, Vol.97, no.23.
- Hatmanani, Sen. 2010. Herbal. Erlangga : Jakarta.
- Iradjajanegara dan Wahyudi, Priyo. 2010. Uji Sitotoksisitas Ekstrak Etanol Herba Ceplukan (*Physalis angulata*) terhadap Sel T47D secara Invitro. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia* Edisi April 2010, Vol.8, no.1, hal 41-47.
- Kintoko, Azimahtol Hawariah and Lope Pihie. 2008. Efek Antiproliferasi Ekstrak Kloroform Dari *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. Pada Titisan Sel Kanker Manusia Rev. Universiti Kebangsaan Malaysia: Serdang.
- Lieberman. 2001. *Sel Hela*. <http://www.dakdem.com/artikel-bebas/20-biografi/30-henrietta-lacks-dan-sel-hela>. Dikutip tanggal 16 Desember 2009.
- Priyanto. 2007. *TOKSISITAS (Obat, Zat Kimia, dan Terapi Antidotum)*. LESKONFI : Jakarta Barat.
- Vincent, Kim. 2007. *Probit Analysis*. <http://userwww.sfsu.edu/~efc/classes/biol710/probit/ProbitAnalysis.pdf>. Dikutip 12 Februari 2011.

