

(Cytotoxic Activity,  
Antiproliferation and Induced  
Apoptosis of Salung Leaf  
(*Psychotria viridiflora* Reinw. Ex.  
Blume) on Cancer Cell of Servix  
HeLa)

*by* Salni Salni

---

**Submission date:** 01-May-2020 07:30AM (UTC+0700)

**Submission ID:** 1312651812

**File name:** Salni\_JIFI\_2018.pdf (454.87K)

**Word count:** 4686

**Character count:** 27659

## Aktivitas Sitotoksik, Antiproliferasi dan Penginduksi Apoptosis Daun Salung (*Psychotria viridiflora* Reinw. ex. Blume) terhadap Sel Kanker Serviks HeLa

### (Cytotoxic Activity, Antiproliferation and Induced Apoptosis of Salung Leaf (*Psychotria viridiflora* Reinw. Ex. Blume) on Cancer Cell of Servix HeLa)

ARLINA ISMARYANI<sup>1</sup>, SALNI<sup>2\*</sup>, ARUM SETIAWAN<sup>2</sup>, TRIWANI<sup>3</sup>

<sup>1,3</sup>Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya.

<sup>2</sup>Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sriwijaya.

Diterima 15 Maret 2018, Disetujui 29 Agustus 2018

5

**Abstrak:** Kanker serviks menduduki urutan kedua dari penyakit kanker yang menyerang perempuan di dunia dan urutan pertama untuk wanita di negara berkembang. Tumbuhan Salung (*Psychotria viridiflora* Reinw. Ex. Blume) telah dimanfaatkan secara turun temurun untuk mengobati berbagai macam penyakit. Tujuan penelitian untuk mengetahui aktivitas ekstrak dan fraksi daun salung sebagai agen sitotoksik, antiproliferasi dan penginduksi apoptosis pada sel kanker serviks HeLa. Konsentrasi ekstrak dan fraksi yang diujikan adalah 640; 320; 160; 80; 40 µg/mL, sedangkan cisplatin 200; 100; 50; 25 µg/mL. Hasil penelitian didapatkan nilai IC<sub>50</sub> ekstrak 380,7 µg/mL, fraksi *n*-heksan sebesar 229,3 µg/mL, fraksi etil asetat sebesar 116,8 µg/mL, dan fraksi metanol air sebesar 562,8 µg/mL, berdasarkan nilai IC<sub>50</sub> fraksi etil asetat mempunyai aktivitas sitotoksik kategori cukup aktif. Hasil *doubling time* fraksi etil asetat menggandakan diri pada jam ke 58 lebih kecil dari cisplatin yang menggandakan diri pada jam ke 64,5 dan kontrol sel pada jam ke 41. Hasil *flowcytometry* menunjukkan fraksi etil asetat menginduksi apoptosis sebesar 72,82% sedangkan cisplatin sebesar 87,96%. Fraksi etil asetat dari ekstrak daun salung berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat antikanker.

**Kata kunci:** Daun Salung (*Psychotria viridiflora* Reinw. Ex. Blume), antiproliferasi, apoptosis.

**Abstract:** Cervical cancer ranks second of cancer that affects women in the world and the first order for women in developing countries. Plant Salung (*Psychotria viridiflora* Reinw. Ex. Blume) have been used for generations to treat various diseases. The purpose of the study to determine the effects of leaf extracts and fractions Salung as cytotoxic, antiproliferation and inducer of apoptosis in HeLa cervical cancer cells. The concentration of extracts and fractions of 640; 320; 160; 80; 40 µg/mL, while cisplatin using a concentration of 200; 100; 50; 25 µg/mL. The results showed IC<sub>50</sub> extract value 380.7 µg/mL. *n*-hexane fraction amounted to 229.3 µg/mL. ethyl acetate fraction of 116.8 µg/mL, and methanol-water fraction amounted to 562.8 µg/mL, so that the ethyl acetate fraction had enough categories active cytotoxic activity based on the IC<sub>50</sub>. The ethyl acetate fraction has doubling time on the hour to 58 while the cisplatin on the hour to 64.5 and the control cell on the hour to 41. The flow cytometry showed that ethyl acetate fraction induced apoptosis by 72.82% while cisplatin of 87.96%. The fraction of ethyl acetate from leaf extract has the potential to be developed as an anticancer drug.

**Keywords:** Leaf Salung (*Psychotria viridiflora* Reinw. Ex. Blume), antiproliferation, apoptosis.

\* Penulis korespondensi: Hp : 081264943000  
Email: salnibasir@yahoo.com

## PENDAHULUAN

KANKER Serviks menduduki urutan kedua dari penyakit kanker yang menyerang perempuan di dunia dan urutan pertama untuk wanita di negara berkembang. Dari data badan kesehatan dunia diketahui terdapat 493.243 jiwa per tahun penderita kanker serviks baru di dunia dengan angka kematian karena kanker ini sebanyak 273.505 jiwa per tahun. Di Indonesia, terdapat 90-100 kasus kanker serviks per 100.000 penduduk. Kasus baru kanker serviks ditemukan 40-45 kasus per hari<sup>(1)</sup>.

Pengobatan kanker serviks sering dilakukan dengan berbagai cara, antara lain, operasi atau pembedahan, penyinaran atau radiasi, kemoterapi serta yang sekarang berkembang adalah imunoterapi. Namun, terapi pembedahan tidak dapat dilakukan khususnya pada sel kanker yang telah menyebar, sedangkan kemoterapi dan radiasi juga memiliki beberapa keterbatasan. Kemampuan sinar yang biasa digunakan untuk radiasi mengalami penurunan efektivitas seiring peningkatan ukuran tumor, karena penambahan dosis yang diberikan melebihi batas toksisitasnya pada jaringan dan organ normal manusia. Penggunaan obat kimia seperti kemoterapi mengalami kegagalan untuk menginduksi kematian sel kanker secara terprogram<sup>(1)</sup>. Berdasarkan fakta-fakta tersebut pengembangan obat antineoplastik baru menjadi isu kunci dan pilihan strategis untuk menggantikan pengobatan kanker lama atau sebagai usaha meningkatkan sensitivitas modalitas terapi yang telah ada sebelumnya. Salah satu alternatif pengobatan antikanker yang sudah dikembangkan adalah obat herbal<sup>(2)</sup>.

Penelitian antikanker telah dilakukan terhadap beberapa jenis familia Rubiaceae antara lain tanaman Sarang Semut (*Myrmecodia pendans*), tanaman Mengkudu (*Morinda citrifolia*), Gambir (*Uncaria gambir*), biji Kopi (*Coffea* sp.). Kandungan senyawa antikanker pada familia Rubiaceae bermacam-macam antara lain pada tanaman Sarang Semut (*Myrmecodia pendans*) mengandung senyawa flavonoid, tanin dan tokoferol<sup>(3)</sup>. Tanaman Mengkudu (*Morinda citrifolia*) mengandung flavonoid, skopoletin, antrakuinon, dan alkaloid<sup>(4)</sup>. Tanaman Gambir (*Uncaria gambir*) mengandung senyawa flavonoid, dan sejumlah alkaloid (tanin, turunan dihidro dan oksanya), katekin serta zat penyamak<sup>(5)</sup>. Biji Kopi (*Coffea* sp.) mengandung senyawa fenolik, flavonoid dan alkaloid<sup>(6)</sup>.

Penapisan aktivitas senyawa aktif antikanker dapat dilakukan dengan cara kemotaksonomi, yaitu didasarkan pada kemiripan kandungan kimia pada familia atau genus tumbuhan yang sama. Tumbuhan

Salung telah dimanfaatkan secara turun temurun untuk mengobati berbagai macam penyakit<sup>(7)</sup>. Tumbuhan Salung juga termasuk familia rubiaceae diduga mengandung unsur senyawa yang sama sehingga perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui efek ekstrak dan fraksi daun Salung (*Psychotria viridiflora* Reinw. Ex. Blume) sebagai sitotoksik, antiproliferasi dan penginduksi apoptosis pada sel kanker serviks HeLa.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Simplisia daun Salung (*Psychotria viridiflora* Reinw. Ex. Blume) diambil di desa Tebedak kecamatan Payaraman, Kabupaten Ogan Ilir, Sumatera Selatan, pelarut *n*-heksan, etil asetat dan metanol, cisplatin, sel HeLa dari laboratorium parasitologi UGM, FBS (*Fetal Bovin Serum*) 10%, penisilin-streptomisin 1%, fungizone 0,5%, tripsin-EDTA<sup>(8)</sup> (*Ethylenediaminetetraacetic acid*) 0,25%, 3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida (MTT), SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*) 10% dalam 0,01 N HCl, stok sampel (10 mg) dalam eppendorf, pelarut DMSO, Media Kultur (MK), *Phosphat Buffer Saline* (PBS), tripsin-EDTA 0,25%, RNase, *Propidium iodide*.

**Alat.** Blender, *rotary evaporator*, gelas ukur, labu pisah 1000 mL, penangas air, cawan petri, timbangan analitik, plat *silica*, mikropipet 10, 20, 200 dan 1000  $\mu$ L, botol duran 100 mL, *conical tube*, pipet Pasteur steril atau mikropipet 1000  $\mu$ L, tabung reaksi kecil, rak tabung kecil, 96-well plate, 6-well plate, *conical tube*, dan ELISA reader dengan panjang gelombang 595 nm dan 550 nm, votex, tabung sentrifus 1,5 mL, rak tabung kecil, sentrifugator, inkubator CO<sub>2</sub>, penangas air (37 °C) dan FACS-Calibur, Triton-X, buangan untuk media bekas dan PBS.

**METODE.** Penelitian menggunakan beberapa metode, ekstraksi dengan metode maserasi, simplisia daun Salung direndam dengan pelarut methanol selama 2 x 24 jam kemudian disaring, diulangi sampai 3 kali, ekstrak cair yang diperoleh diuapkan dengan rotapavor sampai didapatkan ekstrak kental. Fraksinasi dengan metode Fraksinasi Cair-Cair (FCC), Fraksinasi dilakukan dengan cara: ekstrak kental di larutkan dalam metanol air dengan perbandingan 3:7 (450 mL ekstrak: 1050 mL etanol air) sehingga didapatkan sebanyak 1500 mL fraksi metanol air, selanjutnya dimasukkan dalam labu pisah, ditambahkan 4 x 250 mL *n*-heksan, di kocok secara perlahan-lahan setelah itu didiamkan kemudian terjadi pemisahan antara *n*-heksan dan etanol air dengan menggunakan corong pisah, kemudian diulangi beberapa kali sampai larutan berwarna bening. Setelah didapatkan fraksi *n*-heksan, dilanjutkan dengan fraksinasi etil

asetat dengan proses yang sama seperti fraksinasi *n*-heksana untuk mendapatkan fraksi etil asetat cair 1 sanya merupakan fraksi methanol air. Selanjutnya fraksi *n*-heksan cair, fraksi etil asetat cair, dan fraksi metanol air diuapkan dengan alat rotary evaporatory sampai berbentuk pasta. 2

**Preparasi dan Panen Sel.** Sel diambil dari tangki nitrogen cair, kemudian dicairkan dalam penangas air 37 °C. Setelah itu disemprotkan dengan etanol 70%, sel dalam cryotube dimasukkan ke dalam LAF dan dipindahkan dengan menggunakan mikropipet ke dalam tabung conikel yang berisi suspensi sel, disentrifuge pada 600 rpm selama 5 menit, lalu supernatan dibuang. Selanjutnya ditambahkan media yang baru kedalam konikel yang berisi pelet dan disuspensikan hingga homogen. Suspensi sel ditumbuhkan dalam tissue culture dish yang diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 37 °C. Kondisi sel selanjutnya diamati dibawah mikroskop kemudian diinkubasi pada inkubator CO<sub>2</sub> 5%. Setelah 24 jam dilakukan penggantian media kultur. Sel ditumbuhkan sampai konfluen dan jumlahnya cukup untuk perlakuan. Setelah konfluen dilakukan panen sel dengan cara membuang media kultur lalu dicuci dengan PBS 2x untuk melepas sel dari dasar culture dish ditambahkan tripsin-EDTA 0,25% kemudian diinkubasi selama 3 menit dalam inkubator CO<sub>2</sub>, Tripsin-EDTA diinaktivasi dengan menambahkan media kultur kemudian suspensi sel dire suspensi lalu suspensi dipindahkan pada conical tube. Jumlah sel dihitung dengan menggunakan hemocytometer dan cell counter.

**Pem3ratan Larutan Stok Uji Ekstrak dan Fraksi.** Sebelum dilakukan uji sitotoksik, terlebih dahulu dibuat larutan stok sampel dengan 8 ara mencampur ekstrak etanol, fraksi etil asetat, fraksi *n*-heksan dan fraksi etanol air dari daun Salung 3 sychotria viridiflora Reinw. Ex. Blume) dengan media D13EM (*Dulbecco's Modification of Eagle Medium*). Larutan stok dibuat dengan 8 ara menimbang ekstrak etanol, fraksi etil asetat, fraksi 3-heksan dan fraksi metanol air dari daun Salung kemudian ditambah DMSO sebanyak 30 µL dan ditambahkan dengan media DMEM hingga 1000 µL, sehingga diperoleh konsentrasi tertentu. Dari konsentrasi larutan stok tersebut kemudian dibuat seri konsentrasi larutan uji, preparasi dilakukan dalam Laminar Air Flow Cabinet secara aseptis<sup>(8)</sup>.

**Uji Sitotoksisitas.** Dari larutan stok sampel dibuat larutan uji dengan konsentrasi 320; 160; 80; 40 µL/mL untuk ekstrak etanol dan fraksi etil asetat, etanol air, serta *n*-heksan. Cisplatin diencerkan dengan DMEM dengan konsentrasi 200, 100, 50, 25 µL/mL. Selanjutnya sel diberi perlakuan ekstrak

dan fraksi, setelah itu diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> selama 24 jam, kemudian tiap sumuran diberi larutan MTT sejumlah 10 µL, empat jam kemudian 4 lanjutkan dengan pemberian reagen penghenti reaksi (SDS 10% dalam HCL 0,01 N). Kemudian plate dibungkus dengan kertas atau aluminium foil dan inkubasikan ditempat gelap pada temperatur kamar 4 lama semalam. Setelah 24 jam plate dimasukkan ke dalam ELISA reader. Dibaca absorbansi masing-masing sumuran dengan panjang gelombang 550 nm. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 550 nm, yaitu panjang gelombang optimum agar diperoleh pengukuran yang peka dan spesifik<sup>(9)</sup>. Data dari uji sitotoksisitas digunakan untuk menghitung kadar yang menyebabkan hambatan proliferasi sel 50% (IC<sub>50</sub>) dengan analisa probit. Persentase sel hidup setelah perlakuan pada masing-masing kadar dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ kematian sel} = \frac{(\sum \text{sel hidup pada kontrol} - \sum \text{sel hidup pada sampel})}{\sum \text{sel hidup pada kontrol}} \times 100\%$$

Setelah didapatkan persen kematian sel pada masing-masing konsentrasi bahan uji, maka langkah selanjutnya adalah menentukan nilai IC<sub>50</sub> dengan menggunakan metode regresi linear untuk mendapatkan linearitas antara 1 dar konsentrasi dengan persen kematian sel. IC<sub>50</sub> adalah konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% populasi sel, 7 hingga dapat diketahui potensi sitotoksisitasnya. Uji sitotoksik ini digunakan untuk menentukan nilai IC<sub>50</sub>. Nilai IC<sub>50</sub> menunjukkan nilai kadar konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai ini merupakan patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel. Nilai IC<sub>50</sub> menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai bahan toksik, semakin besar harga IC<sub>50</sub> maka senyawa tersebut semakin tidak toksik<sup>(10)</sup>.

**Uji Antiproliferasi.** Dilakukan dengan menentukan doubling time sel pada waktu inkubasi. Perhitungan dilakukan dengan cara: Konsentrasi Fraksi etilasetat yang diujikan ½ IC<sub>50</sub> yaitu sebesar 1 r 58,4 µg/mL dan cisplatin sebesar 23,6 µg/mL. Sel yang digunakan sejumlah 5 x 10<sup>3</sup> sel/sumuran didalam 96 plate well. Setelah diberikan perlakuan maka sel di 1 kubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 37 °C pada 0 jam, 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Selanjutnya diukur absorbansinya dengan alat ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm. Dari hasil yang didapat maka dibuat grafik antara log jumlah sel hidup dan lama waktu inkubasi kemudian ditentukan perbedaan waktu untuk mencapai jumlah 2 kali sel awal (mengetahui doubling time). Dari persamaan yang diperoleh maka dapat ditentukan nilai doubling time.

**Uji Apoptosis.** Sel HeLa dipanen sel sebanyak  $5 \times 10^5$  sel/sumuran di tanam dalam 6 plate well masing-masing sebanyak 2000  $\mu$ L Media Kultur (MK), kemudian di inkubasi hingga sel HeLa siap untuk diberi perlakuan. Sel diberi dosis perlakuan fraksi etil asetat 116,8  $\mu$ g/mL, dan cisplatin 47,2  $\mu$ g/mL. Kemudian sel di inkubasi selama 24 jam pada inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 37 °C. Setelah di inkubasi, media sel dimasukkan kedalam conical dan selanjutnya dipanen dengan penambahan tripsin-EDTA 0,25% sebanyak 150  $\mu$ g/sumuran. Media kultur ditambahkan sebanyak 2000  $\mu$ g/mL kemudian diresuspensi agar menjadi sel tunggal. Sel disentrifuge dengan kecepatan 200 rpm selama 5 menit dan supernatant dibuang, ditambahkan PBS sebanyak 100  $\mu$ g dan dipindahkan ke dalam cyrotube lalu di sentrifuge kembali dengan kecepatan 600 rpm selama 3 menit. Kemudian supernatant dibuang dan ditambahkan dengan reagen annexin V dan PI (Propidium Iodida) lalu dibaca dengan menggunakan flowcytometry. Pengamatan induksi apoptosis dilakukan untuk mengetahui penyebab kematian sel baik apoptosis maupun nekrosis. Jika annexin V+ berarti ada apoptosis sedangkan kalau PI- berarti ada nekrosis. Analisis apoptosis diperoleh dari hasil pembacaan hasil flowcytometry yang di analisis menggunakan Microsoft excel. Kuadran R1 menunjukkan sel yang hidup, R2 menunjukkan early apoptosis, R3 menunjukkan late apoptosis, R4 menunjukkan nekrosis. Selain dari kuadran R1-R4 pembacaan apoptosis juga bisa dilakukan berdasarkan pewarnaan. Pada hasil flowcytometry didapatkan empat macam warna yang berbeda yaitu hijau (Anexin V- atau PI-) menunjukkan sel hidup, kuning (annexin V+ atau PI-) menunjukkan sel yang mengalami apoptosis awal, merah muda (annexin V+ atau PI+) menunjukkan sel yang mengalami apoptosis akhir, dan merah (annexin V- atau PI+) menunjukkan sel yang nekrosis<sup>(9)</sup>, hasil pembacaan flowcytometry dapat dilihat pada Gambar 1.

Keterangan:

(1) kontrol sel; (2) fraksi etil asetat; dan (3) cisplatin. Hijau (LL): Sel hidup; Merah muda (UR): Apoptosis akhir; Kuning (LR) : Apoptosis awal; dan Merah (UL): Nekrosis.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Ekstraksi dan Fraksinasi.** Hasil ekstraksi diperoleh ekstrak 45,7 g (18,28%) dari 250 g simplisia daun Salung. Ekstrak daun Salung sebanyak 31,8 g difraksinasi dengan metode FCC (Fraksi Cair-Cair) dengan pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol air secara kesinambungan dengan sifat kepolaran pelarut yang berbeda-beda. Berat fraksi yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 1.

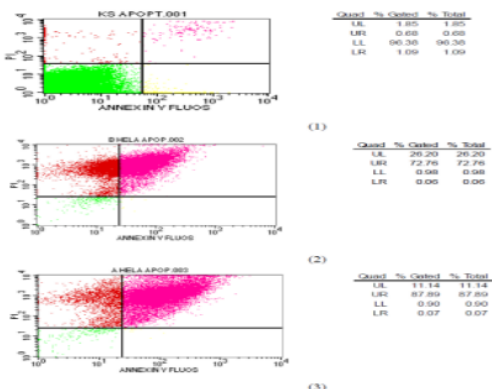
**Tabel 1. Hasil Fraksinasi daun salung (Psychotria viridiflora Reinw. Ex. Blume)**

Pelarut	Berat (gram)	Persentase (%)
Fraksi n-heksan	4,7	14,8
Fraksi etil asetat	8,4	26,4
Fraksi metanol air	18,7	58,8
Total	31,8	100

Pada Tabel 1, dapat dilihat hasil fraksinasi ekstrak daun salung yang memiliki berat paling besar adalah fraksi metanol air 58,8% dibandingkan dengan fraksi n-heksan dan etil asetat. Tingginya kadar fraksi metanol air menunjukkan banyaknya senyawa non polar dalam ekstrak daun salung. Berat fraksi yang didapatkan berbeda-beda tergantung dari pelarut yang digunakan, namun besar kecilnya kemampuan sitotoksik suatu fraksi tidak dipengaruhi oleh berat fraksi, kemudian ekstrak dan ketiga macam fraksi yang diperoleh di uji aktivitas antikankernya terhadap sel HeLa dengan metode MTT assay.

**Uji Sitotoksik.** Uji sitotoksik digunakan untuk memprediksi keberadaan obat sitotoksik dari bahan alam yang berpotensi sebagai antikanker. Hasil pembacaan ELISA reader menghasilkan nilai absorbansi dari enam ulangan pada masing-masing konsentrasi dan nilai rata-rata persentase kematian sel HeLa setelah diberi perlakuan. Hasil uji sitotoksik dari ekstrak dan fraksi daun salung dapat dilihat pada Tabel 2.

Dari Tabel 2, diketahui bahwa ekstrak dan fraksi daun salung mempunyai aktivitas antikanker terhadap sel HeLa. Nilai IC<sub>50</sub> terbesar diberikan oleh fraksi metanol-air yaitu 562,8  $\mu$ g/mL, hal ini menunjukkan bahwa fraksi metanol air mempunyai aktifitas sitotoksik yang paling lemah, sedangkan nilai IC<sub>50</sub> terendah terdapat pada fraksi etil asetat dengan nilai IC<sub>50</sub> 116,8  $\mu$ g/mL sehingga dapat disimpulkan bahwa



**Gambar 1. Hasil analisis dengan flowcytometry.**

fraksi etil asetat paling aktif dibandingkan dengan fraksi *n*-heksan dan fraksi metanol air. Fraksi etil asetat tergolong kedalam bahan antikanker cukup aktif. Berdasarkan klasifikasi aktivitas sitotoksik ekstrak terhadap sel kanker dapat digolongkan kategori sangat aktif jika nilai  $IC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ , kategori aktif jika nilai  $IC_{50}$  10-100  $\mu\text{g/mL}$ , dan kategori cukup aktif jika nilai  $IC_{50}$  100-500  $\mu\text{g/mL}$ <sup>(11)</sup>.

Pada kelompok kontrol positif (cisplatin) nilai  $IC_{50}$  yang dihasilkan sangat rendah yaitu 47,2  $\mu\text{g/mL}$  sehingga jauh lebih toksik dari ekstrak dan fraksi daun Salung, cisplatin merupakan obat sitotoksik dengan efektifitas tinggi dan digunakan secara luas namun efek samping penggunaannya juga tinggi. Efek samping cisplatin adalah nefrotoksitas dimana persentase kejadian sebesar 20-30%<sup>(12)</sup>. Berbagai efek samping yang mungkin terjadi pada penggunaan cisplatin adalah ototoksitas, gastrotoksitas, supresi sumsum tulang reaksi alergi dan nefrotoksitas<sup>(13)</sup>.

Fraksi etilasetat dari daun salung dengan nilai  $IC_{50}$  116,8  $\mu\text{g/mL}$  lebih aktif dibandingkan dengan ekstrak etanol buah Mengkudu yang memiliki potens sebagai agent kemopreventif melalui mekanisme sitotoksik terhadap sel kanker serviks La dengan nilai  $IC_{50}$  yaitu 4.094  $\mu\text{g/mL}$ <sup>(14)</sup>, dan fraksi etil asetat dari tanaman Sarang Semut memiliki nilai  $LC_{50}$  sebesar 938,003  $\mu\text{g/mL}$ <sup>(15)</sup>. Berdasarkan nilai  $IC_{50}$  yang di dapat pada penelitian ini diketahui bahwa pada fraksi etil asetat nilai  $IC_{50}$  sebesar 116,8  $\mu\text{g/mL}$  lebih kecil dari fraksi yang lain dan ekstrak sehingga fraksi etil asetat merupakan fraksi aktif yang dilanjutkan pada uji antiproliferasi dan apoptosis.

**Uji Antiproliferasi.** *Cell cycle progression* merupakan parameter utama dalam mengukur sifat proliferative suatu sel kanker, penghambatan *cell cycle progression* dilakukan dengan uji *doubling time* menggunakan metode MTT. Konsentrasi larutan uji yang digunakan adalah dibawah nilai  $IC_{50}$

Tabel 2. Hasil rata-rata absorbansi, persen kematian sel HeLa dan nilai  $IC_{50}$ .

Konsentrasi bahan uji ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rata-rata absorbansi	(%) Kematian sel HeLa	Nilai $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Ekstrak etanol	640	0,316	60,721
	320	0,411	48,912
	160	0,436	45,805
	80	0,512	36,358
	40	0,572	28,899
Fraksi n-heksan	640	0,267	66,812
	320	0,321	60,099
	160	0,440	45,308
	80	0,468	41,827
	40	0,477	40,709
Fraksi etil asetat	640	0,238	70,416
	320	0,329	59,105
	160	0,354	55,997
	80	0,421	47,669
	40	0,449	44,189
Fraksi methanol air	640	0,386	52,019
	320	0,465	42,200
	160	0,534	33,623
	80	0,561	30,267
	40	0,640	20,447
Cisplatin	200	0,226	71,908
	100	0,319	60,316
	50	0,378	53,014
	25	0,457	43,132

yang diperoleh pada uji sitotoksitas agar sel dapat diamati pertumbuhan serta morfologinya supaya sel tidak terlalu banyak yang mati. Apabila digunakan konsentrasi diatas  $IC_{50}$  dikhawatirkan sel terlalu banyak yang mati sebelum 72 jam inkubasi sehingga pengamatan kinetika proliferasi tidak dapat dilakukan. Pada penelitian ini hanya menguji fraksi aktif etil asetat dengan konsentrasi  $\frac{1}{2} IC_{50}$  yaitu sebesar 58,4  $\mu\text{g/mL}$  dan cisplatin sebesar 23,6  $\mu\text{g/mL}$ .

Tabel 3 dan 4 menunjukkan fraksi etil asetat memiliki *doubling time* 58 jam yang artinya pada jam ke 58 sel akan membelah diri menjadi dua, sedangkan pada kontrol sel membelah menjadi duapada 41 jam. Dari nilai *doubling time* dapat diketahui penghambatan bahan uji terhadap kecepatan sel untuk berproliferasi dengan membandingkan nilai *doubling time control* dengan nilai *doubling time sampel*. Ini berarti fraksi etil asetat mengandung senyawa yang dapat menyebabkan terjadinya *cell cycle arrest* sehingga menyebabkan kemampuan proliferasi sel menurun, dimana besarnya kemampuan antiproliferasi tergantung kadar konsentrasi fraksi aktif yang diberikan. Berdasarkan hal tersebut dapat disimpulkan semakin tinggi kadar konsentrasi fraksi aktif etil asetat semakin tinggi pula terjadinya antiproliferasi pada pertumbuhan sel HeLa melalui mekanisme penundaan waktu penggandaan. Kemampuan ini diduga karena adanya kandungan alkaloid dan flavonoid dalam daun salung.

Senyawa alkaloid dapat menghambat proliferasi melalui inhibisi proses oksidatif yang dapat menyebabkan inisiasi kanker. Mekanisme ini diperantarai penurunan enzim Xanthin Oksidase Siklooksigenase (COX) dan Lipooksigenase (LOX) yang diperlukan dalam proses prooksidasi sehingga menunda siklus sel<sup>(16)</sup>. Senyawa alkaloid juga mampu mengikat tubulin (protein penyusun mikrotubulus) sehingga dapat menghambat polimerase protein sehingga mengganggu proliferasi sel<sup>(17)</sup>.

Flavonoid memiliki aktivitas antioksidan yang lebih kuat melawan *perioxyl radical* dibandingkan dengan vitamin C dan E. Zat flavonoid dapat menurunkan resiko terjadinya kanker paru. Flavonoid dapat menstimulasi aktivitas enzim sehingga menginduksi apoptosis, menghambat siklus sel, mengatur fungsi dari imun tubuh dan menghambat inflamasi, antiproliferasi dan angiogenesis sel kanker<sup>(18)</sup>. Mekanisme kerja flavonoid dalam mencegah hkan mengobati kanker yang telah terungkap adalah inaktivasi karsinogen, antiproliferasi, penghambatan siklus sel, induksi apoptosis, diferensiasi, dan inhibisi angiogenesis<sup>(19)</sup>.

**Uji Aktivitas Apoptosis.** Hasil uji apoptosis dengan *flowcytometry* dapat dilihat pada Gambar

1. Empat warna yang terbentuk disebabkan oleh sel yang memancarkan epi-fluoresensi oleh ikatan anexin V atau PI lalu ditangkap oleh sinar UV. Data hasil pengukuran *flowcytometry* dapat dilihat pada Tabel 5 dan Gambar 1. Pada Tabel 5 tersebut menunjukkan bahwa fraksi daun salung memiliki aktivitas apoptosis yang cukup baik, hal ini terlihat bahwa persentase apoptosis pada fraksi etil asetat sebesar 72,82% sedangkan pada cisplatin menunjukkan persentase apoptosis sebesar 87,96%. Ini berarti fraksi etil asetat daun salung memiliki efektivitas untuk meningkatkan apoptosis terhadap sel HeLa. Potensi fraksi etil asetat daun salung dalam memacu apoptosis kemungkinan disebabkan oleh senyawa aktif yang terkandung dalam fraksi yaitu senyawa alkaloid dan flavonoid.

Pengendalian siklus sel dilakukan agar siklus sel berjalan normal. *Cyclin dependent kinase* (Cdk) bersama dengan siklin adalah pengendali utama siklus sel, yang menyebabkan pergerakan dari fase G1 ke fase S atau dari fase G2 ke fase M. *Maturation Promotion Factor* (MPF) bersama Cdk dan siklin menjadi pencetus progresivitas siklus sel. Protein p53 berfungsi menghambat siklus sel bila terjadi kerusakan DNA, dan bila kerusakan cukup berat dapat menyebabkan apoptosis<sup>(20)</sup>. Sedangkan protein p27 adalah protein yang mengikat siklin dan Cdk, sehingga terjadi hambatan menuju fase S21. Selanjutnya fraksinasi daun mengkudu menunjukkan adanya kenaikan persen kematian sel alami (apoptosis) seiring dengan kenaikan kadar protein terhadap sel kanker serviks HeLa dengan nilai  $IC_{50}$  yang rendah yaitu 6,9  $\mu\text{g/mL}$ <sup>(21)</sup>.

Beberapa penelitian antikanker pada familia rubiaceae yang telah dilaporkan seperti tanaman Sarang Semut (*Myrmecodia pendans* Merr & Perry) mengandung flavonoid dan tanin yang memiliki aktivitas antiproliferasi dan antikanker<sup>(3)</sup>. Tanaman Mengkudu (*Morinda citrifolia*) mengandung flavonoid, skopoletin, antrakuinon, dan alkaloid memiliki efek terapi yang luas termasuk aktivitas antikanker, dalam praktik klinis dan percobaan pada hewan model di laboratorium<sup>(4)</sup>. Gambir (*Uncaria gambir*) mengandung senyawa flavonoid dan sejumlah alkaloid (tanin, turunan dihidro- dan oksonya), katekin serta zat penyamak yang bersifat antiproliferasi dan menginduksi apoptosis<sup>(5)</sup>. Senyawa fenolik, flavanoid, dan alkanoid dari biji Kopi (*Coffea* sp.) bersifat antiproliferasi dan menginduksi apoptosis<sup>(6)</sup>.

Belum ada publikasi yang melaporkan mengenai aktivitas antikanker dari ekstrak dan fraksi daun Salung (*Psychotria viridiflora*) namun berdasarkan penelitian sebelumnya pada tumbuhan sefamalia rubiaceae yaitu daun Mengkudu menunjukkan adanya kenaikan persen kematian sel alami (apoptosis)

seiring dengan kenaikan kadar protein terhadap sel kanker serviks HeLa dengan nilai  $IC_{50}$  yang rendah yaitu 6,9  $\mu\text{g/mL}$ <sup>(22)</sup> dan ekstrak etanol buah mengkudu memiliki potensi sebagai agen kemopreventif melalui mekanisme sitotoksik terhadap sel kanker serviks HeLa dengan nilai  $IC_{50}$  yaitu 4.094  $\mu\text{g/mL}$ <sup>(13)</sup>, fraksi

etil asetat dari tanaman sarang semut memiliki nilai  $LC_{50}$  sebesar 938,003  $\mu\text{g/mL}$  menunjukkan bahwa fraksi ini mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker<sup>(14)</sup>.

Tabel 3. Hasil rata-rata absorbansi, hasil viabilitas sel dan log jumlah sel hidup.

Konsentrasi bahan uji ( $\mu\text{g/mL}$ )	Waktu inkubasi	Rata-rata absorbansi	Viabilitas sel (%)	Jumlah sel	Log sel
Fraksi Etil Asetat 58,4 $\mu\text{g/mL}$	0 jam	0,222	95,58	4779	3,679
	24 jam	0,543	88,96	8788	3,943
	48 jam	0,607	78,04	9822	3,992
	72 jam	0,665	65,99	10484	4,020
Cisplatin 23,6 $\mu\text{g/mL}$	0 jam	0,318	93,98	4699	3,672
	24 jam	0,473	75,55	7463	3,872
	48 jam	0,566	71,85	9042	3,956
	72 jam	0,639	62,99	10009	4,001
Kontrol Sel	0 jam	0,273	100	5000	3,698
	24 jam	0,302	100	9878	3,994
	48 jam	0,341	100	12585	4,099
	72 jam	0,426	100	15888	4,201

Tabel 4. Hasil doubling time dari persamaan regresi linear.

Bahan uji	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Persamaan garis waktu Inkubasi vs jumlah sel	Y	Doubling time (jam)
Kontrol sel		$y = 0,006X + 3,756$	4	41
Fraksi etil asetat	58,4	$y = 0,004X + 3,748$	3,98	58
Cisplatin	23,6	$y = 0,004X + 3,715$	3,973	64,5

Tabel 5. Hasil flowcytometry fraksi aktif daun salung.

Bahan uji	Sel hidup (%)	Sel apoptosis awal (%)	Sel apoptosis akhir (%)	Total apoptosis (%)	Sel nekrosis (%)
Kontrol sel	96,38	1,09	0,68	1,77	1,85
Fraksi etil asetat	0,98	0,06	72,76	72,82	26,20
Cisplatin	0,90	0,07	87,89	87,96	11,14

## SIMPULAN

Dari penelitian efek ekstrak dan fraksi daun Salung (*Psychotria viridiflora* Reinw. Ex. Blume) sebagai sitotoksik, antiproliferasi dan penginduksi apoptosis pada sel kanker serviks HeLa dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

Ekstrak daun Salung memiliki nilai  $IC_{50}$  380,7  $\mu\text{g/mL}$ , fraksi *n*-heksan sebesar 229,3  $\mu\text{g/mL}$ , fraksi etil asetat sebesar 116,8  $\mu\text{g/mL}$ , dan fraksi metanol air

sebesar 562,8  $\mu\text{g/mL}$ , fraksi etil asetat mempunyai aktivitas sitotoksik dengan kategori cukup aktif.

Fraksi aktif etil asetat dari ekstrak daun Salung memiliki aktivitas antiproliferasi pada jam ke 58 lebih kecil dari cisplatin pada jam ke 64,5.

Fraksi aktif etil asetat daun Salung memiliki kemampuan menginduksi apoptosis sebesar 72,82% sedangkan cisplatin sebesar 87,96%. Fraksi etil asetat dari ekstrak daun salung berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat antikanker.



## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan pada Universitas Sriwijaya yang telah member dukungan dana penelitian Hibah kompetitif pada tahun 2017.

## DAFTAR PUSTAKA

- Pitkin, J., Peattie, A., Magowan, AB. *Obstetric and gynaecology an illustrated colour text*. London. 2003.
- Sudarsono. *Tumbuhan obat II*. Yogyakarta: Pusat Studio Obat Tradisional Universitas Gadjah Mada; 2002.
- Budiani DR, Setiawan Y, Wijono WY, Pesi RN. Pengaruh ekstrak batang Sarang Semut (*Myrmecodia pendans*, Merr & Perry.) terhadap ekspresi protein p53 mutan galur sel kanker payudara T47D. Banjarmasin: I, IAPI; 2007.
- Hermansyah, Herlina, Sugiyama M, Harashima S. Yeast *Saccharomyces cerevisiae* as model to identify Mengkudu (*Morinda citrifolia*) as an anticancer medicinal plants candidates with antiproliferative properties. Palembang: Chemistry Department; 2010.
- Fitri, Dini Mai. Uji aktivitas antiproliferasi senyawa (+)-2-2'-episitokirin A dari jamur *Endofit diaporthe* Sp. yang diisolasi dari tumbuhan Gambir (*Uncaria gambier* Roxb.) terhadap beberapa sel kanker. Magister S. Fakultas MIPA. 2008.
- Haqea MR, Ansaria SA, Rashikh A. *Coffea arabica* seed extract stimulate the celluler immune function and cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice. Iranian J Phamaceutic. 2013.
- Salni. Eksplorasi bahan bioaktif antibakteri untuk mengobati infeksi penyakit kulit di Sumatera Selatan. Lembaga Penelitian Unsri. Indralaya. 2009.
- Utami, Dewi. Aktivitas sitotoksik isolat 5 fraksi etil asetat ekstrak petroleum eter daun *Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl. pada turunan sel kanker serviks manusia (HeLa). *Jurnal Ilmiah Kefarmasian* 1. 2011.
- CCRC. Standart operating procedure cancer chemoprevention research center. Fakultas Farmasi UGM Yogyakarta. 2009.
- Anggraini P. Uji sitotoksik ekstrak etanol 70% buah Kumukus (*Piper cubeba* L.) terhadap sel HeLa. *Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta*. 2008.
- Weerapreeyakul N, Nonpunya A. Barusrux S, Thitimetharoch T and Sripanidkulchai B. Evaluation of the anticancer potential of six herbs against a hepatomacelline. *J. Chinese Medicine*. 2012. 7(15).
- Niss K, Oehadin A, Martakusumah AH, Dewi YA. Perbandingan akurasi berbagai formula untuk mengestimasi laju filtrasi glomerulus pada penderita karsinoma nasofaring stadium lanjut sebelum mendapat terapi cisplatin. *MKB*. 2015.
- Kumiandari N, Susantiningsih T, dan Berawi KN. Efek ekstrak etanol kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) sebagai senyawa nefroprotektor terhadap gambaran histopatologis ginjal yang di induksi Cisplatin. *Majority*. 2015.
- Febriansah R. Kajian secara in vitro ekstrak etanolik buah *Morinda citrifolia* L. sebagai agent khemopreventif kanker payudara yang potensial. Magister Tesis. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah. Yogyakarta. 2010.
- Meyer BN, Ferrigni, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*. 1982.
- Roth A, Kuballa B, Bounthan P, Sevenet T, Beck JP, Anton R. Cytotoxic activity of polyindoline alkaloids of psychotria for steriana (Rubiaceae). *Universite Louis Pasteur. France*. 1986.
- Harborne. *Metode fitokimia penuntun cara modern menganalisis tumbuhan*. Ed II. Bandung: ITB; 2004.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure activity relationships. *Phytochemistry*. 2002.
- Thippeswamy G and Salimath BP. Cricia aromatic extract indices apoptosis and inhibits angiogenesis in ehrlich ascites tumour cells in vivo. *My Science*. 2006.
- Brown JM and Wouters G. Apoptosis, p53. And Tumor Cell Sensitivity to Anticancer Agents. *Cancer Research* 59; 1999. 1391-99.
- Yulia. Uji penghambatan proliferasi sel HeLa dan sel raji oleh ekstrak etanol buah Mengkudu (*Morinda Citrifolia* L.). Tesis. Fakultas Farmasi: Universitas Pancasila. 2009.
- Saphiro, Geoffrey I, and Harper J, Wade. *Anticancer Drug Targets: Cell Cycle and Checkpoint Control*, *J. Clin Invest*. 1999.

# (Cytotoxic Activity, Antiproliferation and Induced Apoptosis of Salung Leaf (*Psychotria viridiflora* Reinw. Ex. Blume) on Cancer Cell of Servix HeLa)

## ORIGINALITY REPORT

19%

SIMILARITY INDEX

18%

INTERNET SOURCES

6%

PUBLICATIONS

6%

STUDENT PAPERS

## PRIMARY SOURCES

1	<a href="http://ejournal.unsri.ac.id">ejournal.unsri.ac.id</a> Internet Source	4%
2	<a href="http://repository.unhas.ac.id">repository.unhas.ac.id</a> Internet Source	2%
3	<a href="http://ojs.jmolekul.com">ojs.jmolekul.com</a> Internet Source	2%
4	<a href="http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id">ccrc.farmasi.ugm.ac.id</a> Internet Source	1%
5	<a href="http://repository.upi.edu">repository.upi.edu</a> Internet Source	1%
6	<a href="http://biodiversitas.mipa.uns.ac.id">biodiversitas.mipa.uns.ac.id</a> Internet Source	1%
7	<a href="http://rv-reskisari.blogspot.com">rv-reskisari.blogspot.com</a> Internet Source	1%
8	Submitted to Padjadjaran University Student Paper	1%

9	<a href="http://publikasiilmiah.ums.ac.id">publikasiilmiah.ums.ac.id</a> Internet Source	1%
10	<a href="http://viona-rosalina.blogspot.com">viona-rosalina.blogspot.com</a> Internet Source	1%
11	<a href="http://repository.unand.ac.id">repository.unand.ac.id</a> Internet Source	1%
12	Makbruri Amin, Irsan Saleh, Rachmat Hidayat. "The Anticancer Activity of Srikaya Leaves Fraction ( <i>Annona squamosa</i> L.): An In Vitro Study", <i>Bioscientia Medicina : Journal of Biomedicine and Translational Research</i> , 2019 Publication	1%
13	<a href="http://repositori.usu.ac.id">repositori.usu.ac.id</a> Internet Source	1%
14	<a href="http://journal.fk.unpad.ac.id">journal.fk.unpad.ac.id</a> Internet Source	1%
15	<a href="http://semirata2017.mipa.unja.ac.id">semirata2017.mipa.unja.ac.id</a> Internet Source	1%
16	<a href="http://journal.uii.ac.id">journal.uii.ac.id</a> Internet Source	1%
17	Submitted to Universitas Jenderal Soedirman Student Paper	1%
18	<a href="http://repository.upnvj.ac.id">repository.upnvj.ac.id</a> Internet Source	1%

---

Exclude quotes      Off

Exclude bibliography      On

Exclude matches      < 1%