

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 Cervix HeLa)

ARLINA ISMARYANI¹, SALNI^{2*}, ARUM SETIAWAN², TRIWAN³

^{1,3}Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya.

^{2*}Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sriwijaya.

Diterima 15 Maret 2018, Disetujui 29 Agustus 2018

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 IC₅₀ 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 IC₅₀ 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 IC₅₀ 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 IC₅₀. 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⁽¹⁾.

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⁽¹⁾. 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⁽²⁾.

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⁽³⁾. Tanaman Mengkudu (*Morinda citrifolia*) mengandung flavonoid, skopoletin, antrakuinon, dan alkaloid⁽⁴⁾. Tanaman Gambir (*Uncaria gambir*) mengandung senyawa flavonoid, dan sejumlah alkaloid (tanin, turunan dihidro dan oksinya), katekin serta zat penyamak⁽⁵⁾. Biji Kopi (*Coffea* sp.) mengandung senyawa fenolik, flavonoid dan alkaloid⁽⁶⁾.

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⁽⁷⁾. 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 (*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 μ L, botol duran 100 mL, *conical tube*, pipet pasteur steril atau mikropipet 1000 μ 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 CO₂, 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 metanol 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 sisanya 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.

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 CO₂ 5% dengan suhu 37 °C. Kondisi sel selanjutnya diamati dibawah mikroskop kemudian diinkubasi pada inkubator CO₂ 5%. Setelah 24 jam dilakukan penggantian media kultur. Sel ditumbuhkan sampai konfulen dan jumlahnya cukup untuk perlakuan. Setelah konfulen 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 CO₂, Tripsin-EDTA diinaktivasi dengan menambahkan media kultur kemudian suspensi sel diresuspendi lalu suspensi dipindahkan pada conical tube. Jumlah sel dihitung dengan menggunakan *hemocytometer* dan *cell counter*.

Pembuatan Larutan Stok Uji Ekstrak dan Fraksi. Sebelum dilakukan uji sitotoksik, terlebih dahulu dibuat larutan stok sampel dengan cara mencampur ekstrak etanol, fraksi etil asetat, fraksi *n*-heksan dan fraksi etanol air dari daun Salung (*Psychotria viridiflora* Reinw. Ex. Blume) dengan media DMEM (*Dulbecco's Modification of Eagle Medium*). Larutan stok dibuat dengan cara menimbang ekstrak etanol, fraksi etil asetat, fraksi *n*-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⁽⁸⁾.

Uji Sitotoksitas. 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

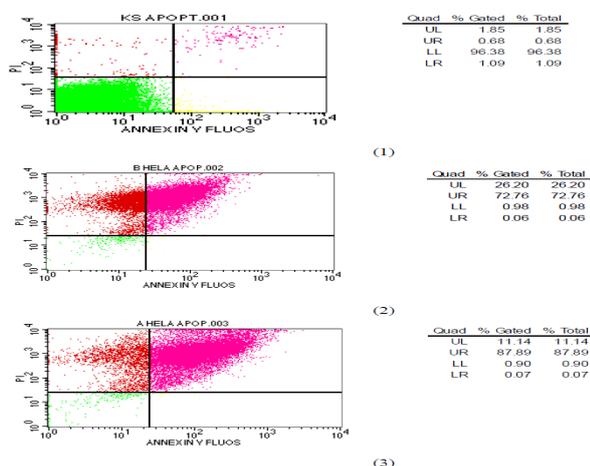
dan fraksi, setelah itu diinkubasi dalam inkubator CO₂ selama 24 jam, kemudian tiap sumuran diberi larutan MTT sejumlah 10 µL, empat jam kemudian dilanjutkan dengan pemberian reagen penghenti reaksi (SDS 10% dalam HCL 0,01 N). Kemudian *plate* dibungkus dengan kertas atau alumunium foil dan inkubasikan ditempat gelap pada temperatur kamar selama 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⁽⁹⁾. Data dari uji sitotoksitas digunakan untuk menghitung kadar yang menyebabkan hambatan proliferasi sel 50% (IC₅₀) 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 IC₅₀ dengan menggunakan metode regresi linear untuk mendapatkan linearitas antara kadar konsentrasi dengan persen kematian sel. IC₅₀ adalah konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% populasi sel, sehingga dapat diketahui potensi sitotoksitasnya. Uji sitotoksik ini digunakan untuk menentukan nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ 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 IC₅₀ menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai bahan toksik, semakin besar harga IC₅₀ maka senyawa tersebut semakin tidak toksik⁽¹⁰⁾.

Uji Antiproliferasi. Dilakukan dengan menentukan *doubling time* sel pada waktu inkubasi. Perhitungan dilakukan dengan cara: Konsentrasi Fraksi etilasetat yang diujikan ½ IC₅₀ yaitu sebesar 58,4 µg/mL dan cisplatin sebesar 23,6 µg/mL. Sel yang digunakan sejumlah 5 x 10³ sel/sumuran didalam 96 *plate well*. Setelah diberikan perlakuan maka sel di inkubasi dalam inkubator CO₂ 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 5×10^5 sel/sumuran di tanam dalam 6 *plate well* masing-masing sebanyak 2000 μL Media Kultur (MK), kemudian di inkubasi hingga sel HeLa siap untuk diberi perlakuan. Sel diberi dosis perlakuan fraksi etil asetat 116,8 $\mu\text{g/mL}$, dan cisplatin 47,2 $\mu\text{g/mL}$. Kemudian sel di inkubasi selama 24 jam pada inkubator CO_2 5% dengan suhu 37°C . Setelah di inkubasi, media sel dimasukkan kedalam *conical* dan selanjutnya dipanen dengan penambahan tripsin-EDTA 0,25% sebanyak 150 μg /sumuran. Media kultur ditambahkan sebanyak 2000 $\mu\text{g/mL}$ kemudian diresuspensi agar menjadi sel tunggal. Sel disentrifuge dengan kecepatan 200 rpm selama 5 menit dan supernatant dibuang, ditambahkan PBS sebanyak 100 μg 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 (Annexin 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⁽⁹⁾, hasil pembacaan *flowcytometry* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil analisis dengan *flowcytometry*.

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 <i>n</i> -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_{50} terbesar diberikan oleh fraksi metanol-air yaitu 562,8 $\mu\text{g/mL}$, hal ini menunjukkan bahwa fraksi metanol air mempunyai aktifitas sitotoksik yang paling lemah, sedangkan nilai IC_{50} terendah terdapat pada fraksi etil asetat dengan nilai IC_{50} 116,8 $\mu\text{g/mL}$ sehingga dapat disimpulkan bahwa

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 $\mu\text{g/mL}$ ⁽¹¹⁾.

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 nefrotoksisitas dimana persentase kejadian sebesar 20-30%⁽¹²⁾. Berbagai efek samping yang mungkin terjadi pada penggunaan cisplatin adalah ototoksisitas, gastrotoksisitas, supresi sumsum tulang reaksi alergi dan nefrotoksisitas⁽¹³⁾.

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 potensi sebagai agent kemopreventif melalui mekanisme sitotoksik terhadap sel kanker serviks HeLa dengan nilai IC_{50} yaitu 4.094 $\mu\text{g/mL}$ ⁽¹⁴⁾, dan fraksi etil asetat dari tanaman Sarang Semut memiliki nilai LC_{50} sebesar 938,003 $\mu\text{g/mL}$ ⁽¹⁵⁾. 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 <i>n</i> -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 |
| <i>Cisplatin</i> | 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 dua pada 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⁽¹⁶⁾. Senyawa alkaloid juga mampu mengikat tubulin (protein penyusun mikrotubulus) sehingga dapat menghambat polimerase protein sehingga mengganggu proliferasi sel⁽¹⁷⁾.

Flavonoid memiliki aktivitas antioksidan yang lebih kuat melawan *peroxy 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⁽¹⁸⁾. Mekanisme kerja flavonoid dalam mencegah bahkan mengobati kanker yang telah terungkap adalah inaktivasi karsinogen, antiproliferasi, penghambatan siklus sel, induksi apoptosis, diferensiasi, dan inhibisi angiogenesis⁽¹⁹⁾.

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⁽²⁰⁾. 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 $\mu\text{g/mL}$ ⁽²¹⁾.

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⁽³⁾. 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⁽⁴⁾. Gambir (*Uncaria gambir*) mengandung senyawa flavonoid dan sejumlah alkaloid (tanin, turunan dihidro-dan oksonya), katekin serta zat penyamak yang bersifat antiproliferasi dan menginduksi apoptosis⁽⁵⁾. Senyawa fenolik, flavanoid, dan alkanoid dari biji Kopi (*Coffea* sp.) bersifat antiproliferasi dan menginduksi apoptosis⁽⁶⁾.

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 $\mu\text{g/mL}$ ⁽²²⁾ 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 $\mu\text{g/mL}$ ⁽¹³⁾, 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⁽¹⁴⁾.

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: PIT, 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 diaporthes* Sp. yang diisolasi dari tumbuhan Gambir (*Uncaria gambier* Roxb.) terhadap beberapa sel kanker. Magister Tesis. 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 hepatomacellline. *J. Chinese Medicine*. 2012. 7(15).
- Nissa CK, Oehadin A, Martakusumah AH, Dewi YA. Perbandingan akurasi berbagai formula untuk mengestimasi laju filtrasi glomerulus pada penderita karsinoma nasofaring stadium lanjut sebelum mendapat kemoterapi cisplatin. *MKB*. 2015.
- Kurniandari 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, Bounthanh 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. *Biochemistry*. 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.