

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN SITOTOKSIK FRAKSI ETANOL
DARI EKSTRAK ETANOLIK DAUN WARU (*Hibiscus Tiliaceus* L.) PADA
SEL KANKER SERVIKS HELA**

*ANTIOXIDANT ACTIVITY AND CYTOTOXIC TEST ETHANOL FRACTION
FROM ETHANOLIC EXTRACT OF WARU (*Hibiscus tiliaceus* L.) LEAVES IN
CERVICAL CANCER HELA CELL LINE*

Wahyuni*, Rifki Febriansah

School of Pharmacy, Faculty of Medicine and Health Science

Muhammadiyah University of Yogyakarta

*Corresponding author: uniew.reza@gmail.com

ABSTRACT

Cervical cancer is a malignant neoplasm of the cervical region, is the third leading cause of cancer deaths among women. Waru (*Hibiscus tiliaceus* L.) leaves contain flavonoid compounds and showed cytotoxic effect against gastric cancer cells, colon cancer cells, and breast cancer cells which has potentially as a chemopreventive agent. This study is aimed at determining the antioxidant and cytotoxic activity of FEDW in HeLa Cervical Cancer Cell Line and in silico tested using molecular docking.

Waru leaves powder extraction was done by maseration using ethanol 70%, then fractionated liquid-liquid extraction with ethanol and chloroform. The study of contain from the ethanol fraction of waru leaves was done by thin-layer chromatography (TLC) method. Antioxidant activities of FEDW was done by DPPH method compared with rutin as a positive control. Cytotoxicity activities of FEDW was done by MTT Assay. To determine the interaction of rutin against protein targets Bcl-xl tested in silico with PLANTS (Protein Ligand ANT System) program.

The result of thin-layer chromatography (TLC) showed that fraction ethanol of Waru leaves consist of flavonoid, The results used DPPH method and rutin as positive control showed that FEDW have antioxidant activities with value of 28 µg/ml and had been potential to be cytotoxic againts HeLa cells with IC₅₀ value of 1605 µg/ml. The result on molecular docking showed that rutin compound have strong potential in inhibited protein Bcl-xl in molecular docking with a docking score of -91.210. In conclusion FEDW have antioxidant activity and have anticancer activity were classified as less toxic, and has inhibitory interactions of protein Bcl-xl.

Keywords : Daun waru (*Hibiscus tiliaceus* L.), Cytotoxicity, Antioxidant, HeLa Cell Line, In Vitro

INTISARI

Kanker serviks adalah neoplasma ganas daerah servikal, merupakan penyebab kematian ketiga akibat kanker pada wanita. Daun waru (*Hibiscus tiliaceus* L.) mengandung senyawa flavonoid dan terbukti memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker lambung, sel kanker kolon dan sel kanker payudara sehingga berpotensi sebagai agen kemopreventif. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dan sitotoksik FEDW pada sel kanker serviks HeLa serta uji *in silico* menggunakan *molecular docking*.

Ekstraksi serbuk daun waru dilakukan dengan metode maserasi menggunakan etanol 70%, difraksinasi cair-cair dengan etanol dan kloroform. Uji kandungan dari fraksi etanol daun waru telah dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Aktivitas antioksidan dari FEDW dilakukan dengan metode DPPH dibandingkan dengan rutin sebagai kontrol positif. Aktivitas sitotoksik dari FEDW dilakukan dengan metode MTT Assay. Untuk mengetahui interaksi rutin terhadap protein target Bcl-x1 dilakukan uji *in silico* dengan program PLANTS (*Protein Ligand ANT System*).

Hasil kromatografi lapis tipis memperlihatkan bahwa fraksi etanol daun waru mengandung flavonoid. Hasil pengujian menggunakan metode DPPH dan rutin sebagai kontrol positif menunjukkan bahwa FEDW mempunyai aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} 28 $\mu\text{g/ml}$ dan potensi sitotoksik terhadap sel HeLa dengan nilai IC_{50} 1605 $\mu\text{g/ml}$. Hasil uji secara *molecular docking* menunjukkan senyawa rutin memiliki potensi yang kuat dalam menghambat protein Bcl-x1 dengan *score docking* sebesar -91,210. Sehingga dapat disimpulkan bahwa FEDW memiliki aktivitas antioksidan dan memiliki aktivitas sitotoksik yang tergolong kurang toksik, serta memiliki interaksi penghambatan protein Bcl-x1.

Kata Kunci : Daun waru (*Hibiscus tiliaceus* L.), Sitotoksik, Antioksidan, Sel HeLa, *In Vitro*

PENDAHULUAN

Kanker serviks adalah neoplasma ganas daerah servikal, merupakan penyebab kematian ketiga akibat kanker pada wanita dengan 529.000 kasus baru di dunia pada tahun 2008. Di Indonesia, pada tahun 2010 jumlah kasus kanker serviks per tahun mencapai 13.762 kasus dengan jumlah

kematian mencapai 7.493 kasus (*World Health Organization*, 2010). Penggunaan terapi radiasi, kemoterapi, banyak menimbulkan efek pada jaringan sehat non target ditandai dengan rontoknya rambut, dan kulit yang menghitam (Jiang *et al.*, 2004). Berbagai kelemahan tersebut memicu perlunya suatu terobosan agen

kemopreventif dengan efektivitas tinggi dan efek samping yang minimal dengan memanfaatkan senyawa yang terkandung dalam bahan alam (Oba *et al.*, 2007).

Salah satu bahan alam yang dapat dijadikan sebagai agen kemopreventif potensial adalah daun waru (*Hibiscus tiliaceus* L.). Penggunaan tanaman waru sebagai agen kemopreventif didukung oleh penelitian-penelitian yang telah dilakukan sebelumnya. Chen, *et al.* (2006) melaporkan bahwa ekstrak etanolik kulit batang waru memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel P-388 dan sel kanker kolon HT-29 secara *in vitro*. Ekstrak metanolik daun waru juga dilaporkan memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker lambung (AGS), sel kanker kolon (HT-29) dengan nilai $IC_{50} > 2,50$ mg/ml dan sel kanker payudara (MDA-MB-435S) (Uddin *et al.*, 2011). Kandungan kimia daun waru adalah saponin, flavonoid dan polifenol. Senyawa flavanoid memiliki aktivitas antioksidan dengan sifat ini flavonoid memiliki potensi untuk menghambat proses inisiasi karsinogenesis dengan cara

menghambat aktivasi karsinogen (Meiyanto *et al.*, 2007).

Rutin, salah satu wakil utama dari flavonoid, terdapat di dalam daun *Hibiscus tiliaceus* (Zhen *et al.*, 2008) dan terbukti menginduksi apoptosis dalam berbagai jenis jalur sel kanker manusia (Koda *et al.*, 2008). Seperti diketahui overekspresi protein Bcl-x1 terjadi pada sel kanker serviks, dimana peningkatan ekspresi Bcl-x1 berhubungan dengan resistensi apoptosis (Liang *et al.*, 1995). Oleh karena itu, penghambatan protein ini akan memblok perkembangan karsinoma dan induksi apoptosis.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa golongan flavonoid pada FEDW, mengetahui adanya aktivitas antioksidan dan aktivitas sitotoksik fraksi etanol dari ekstrak etanolik daun waru (FEDW) terhadap sel HeLa, serta uji *in silico* secara *molecular docking* rutin terhadap Bcl-x1. Sehingga dari penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar pengembangan daun waru sebagai agen kemopreventif.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Penelitian Universitas

Muhammadiyah Yogyakarta, Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada dilaksanakan pada bulan Juni – Oktober 2013. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan secara *in vitro*. Penelitian uji sitotoksik pada sel kanker serviks HeLa merupakan penelitian kuasi eksperimental dengan rancangan *post-test only with control group design* sedangkan penelitian *in silico* dilakukan pada senyawa rutin terhadap protein Bcl-xl.

Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Analisis kromatografi dilakukan terhadap FEDW dengan menggunakan fase diam silika gel 60 F₂₅₄. Fase gerak yang digunakan adalah eluen campuran dari etil asetat : asam asetat glasial : asam format : air dengan perbandingan 100 : 11 : 11 : 27. Plat dielusi dengan cara meletakkannya vertikal di dalam bejana pengembang. dikeringkan dan diamati noda-noda hasil pemisahan menggunakan sinar sinar tampak (*visible*), UV_{254 nm} dan UV_{366 nm}. Deteksi dilakukan dengan penampak bercak menggunakan uap amoniak untuk deteksi flavonoid. Lalu ukur nilai R_f bercak pada plat.

Uji Antioksidan dengan Metode DPPH

Sebanyak 10,0 mg sampel ditimbang dan dilarutkan dengan metanol hingga 10,0 ml, diperoleh larutan induk sampel dengan kadar 1000 µg/ml. Larutan induk dilarutkan dengan pelarut metanol p.a untuk mendapatkan seri kadar FEDW 10; 20; 30; 40 dan 50 µg/ml. Sebagai kontrol positif digunakan rutin dengan pembuatan larutan induk dengan menimbang 5 mg rutin dalam 25 ml metanol. Larutan induk rutin dilarutkan dengan pelarut metanol p.a, diperoleh seri kadar rutin 1; 2; 3; 4 dan 5 µg/ml. Pengujian aktivitas antioksidan sampel dan rutin dengan menambahkan sebanyak 1000 µl larutan DPPH dan 1000 µl metanol ditambahkan ke dalam masing-masing tabung ulir 10 ml. Absorbansi DPPH diukur dengan spektrofotometer *visible* pada panjang gelombang 516 nm. Kemampuan antioksidan diukur sebagai penurunan serapan larutan DPPH akibat adanya penambahan sampel.

Uji Sitotoksik

FEDW ditimbang dengan berat 5 mg dan dilarutkan dalam Dimetil

Sulfoksida (DMSO) sebanyak 100 μL , dibantu dengan alat *vortex*. Diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 5×10^5 $\mu\text{g/ml}$, selanjutnya dari larutan induk tersebut dibuat seri konsentrasi yang akan diujikan yaitu 62,5; 125; 250; 500 dan 1000 $\mu\text{g/ml}$.

Sel HeLa yang telah dikultur kemudian dipanen setelah dipanen sel. Sel dengan kepadatan 1×10^4 sel/sumuran didistribusikan ke dalam *plate* 96 sumuran dan diinkubasi selama 48 jam, ditambahkan 100 μL media kultur yang mengandung DMSO 0,2% saja (kontrol) atau sampel uji dalam bentuk tunggal (fraksi etanol daun waru) diinkubasi selama 48 jam. Ke dalam masing-masing sumuran ditambahkan 100 μL media kultur yang mengandung 5 mg/ml MTT, inkubasi lagi selama 4 jam pada suhu 37°C . Setelah 4 jam, media yang mengandung MTT dibuang, dicuci PBS kemudian ditambahkan larutan *stopper* SDS dalam HCl 0,1% 200 μL untuk melarutkan kristal formazan. Digoyang di atas *shaker* selama 10 menit kemudian dibaca dengan dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm.

Molecular Docking

Struktur protein target diambil melalui *Protein Data Bank* (PDB) dengan membuka link <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explorer.do>? dan download target *docking* dengan PDB ID: 1YSG. Protein target dipreparasi dengan menggunakan YASARA, simpan *file* sebagai YASARA *Object* (simpan sebagai 1YSG.yob). Hapus ligan asli (4FC) sehingga hanya menyisakan protein target saja dengan *pocket* untuk *docking*. Lakukan simulasi program *docking* PLANTS, kemudian lakukan evaluasi dan interpretasi hasil simulasi. Pilih konformasi yang memberikan hasil dengan *score* terendah (dapat dikatakan yang terbaik). Kemudian *docking* ligan asli (4FC), setelah itu dilakukan perhitungan RMSD (*Root Mean Square Deviance*) dengan menggunakan YASARA (RMSD dinyatakan valid apabila lebih rendah dari 2\AA).

ANALISIS HASIL

Kromatografi Lapis Tipis

Perubahan warna pada spot dilihat pada sinar tampak (*visible*), $\text{UV}_{254 \text{ nm}}$ dan $\text{UV}_{366 \text{ nm}}$ dan serta ukur nilai R_f pada plat.

Uji Antioksidan

Besarnya hambatan serapan radikal DPPH melalui perhitungan persentase inhibisi serapan DPPH dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi Kontrol Negatif} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Kontrol Negatif}} \times 100\%$$

Nilai persen inhibisi yang telah dihitung diplotkan dengan nilai konsentrasi masing-masing pada sumbu x dan y. Kemudian nilai IC_{50} dihitung dengan regresi linier $y = b(x) + a$, dengan menyatakan nilai y sebesar 50 dan nilai x sebagai IC_{50} .

Uji Sitotoksik

Absorbansi masing-masing sumuran dikonversikan dalam persen sel hidup. Persen sel hidup dihitung menggunakan rumus :

$$\% \text{ Hidup} = \frac{\text{Absorbansi sel dengan perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi kontrol media sel} - \text{Absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$

Molecular Docking

Dilakukan analisis data nilai *score* dan pose. Molekul dengan nilai *score* terendah menunjukkan afinitas kestabilan yang baik, setelah itu

visualisasi interaksi dengan menggunakan program YASARA.

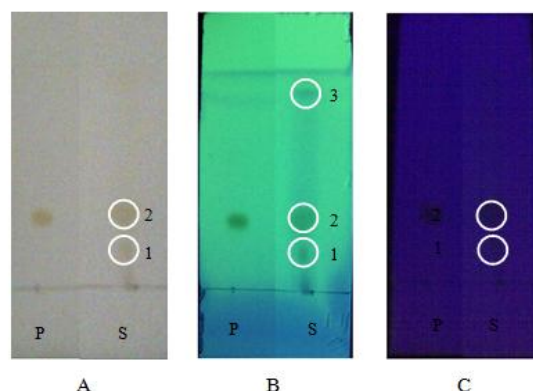
HASIL

Ekstraksi

Serbuk simplisia daun waru sebesar 1.250 gram diperoleh dari 4.000 gram daun waru. Ekstrak kental yang dihasilkan dalam penelitian ini sebanyak 193,5 gram. Proses fraksinasi dilakukan secara bertingkat dengan pelarut etanol dan kloroform. FEDW yang diperoleh setelah diuapkan adalah 72,40 gram dengan rendemen sebesar 56,12%

Kromatografi Lapis Tipis

Hasil identifikasi flavonoid dengan KLT dalam FEDW yang diuapi dengan uap amoniak serta menggunakan pembanding rutin menunjukkan terbentuknya 3 noda yang terpisah dibawah sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Profil Kromatogram hasil KLT FEDW dapat dilihat pada gambar 1.



Keterangan :

Sampel: P = Pembanding Rutin

S = FEDW

Pereaksi : Uap Amoniak

Deteksi : (A) Visibel (B) UV 254 nm (C) UV 366 nm

Adapun nilai Rf dari masing-masing bercak disajikan dalam tabel berikut:

Tabel 1. Nilai Rf FEDW

Nomor Bercak	Rf	Warna Noda		
		Tampak	UV 254 nm	UV 366 nm
1	0,14	Kuning	Peredaman	Ungu tua
2	0,29	Kuning	Peredaman	Ungu tua
3	0,8	-	Peredaman	Ungu tua

Uji Antioksidan dengan Metode DPPH masing larutan uji. Nilai absorbansi yang diperoleh digunakan untuk

Aktivitas antioksidan dari masing larutan uji dapat dianalisis dari data menghitung persentase inhibisi. Persen inhibisi serapan DPPH pada penelitian hasil pengukuran absorbansi DPPH tertera pada Tabel 4 dan Tabel 5.

dengan adanya penambahan masing-

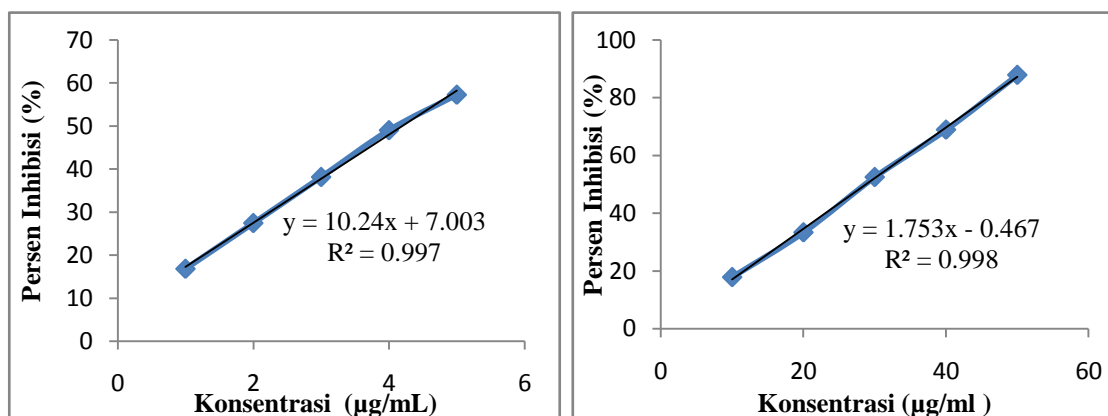
Tabel 2. Persen inhibisi serapan DPPH larutan rutin.

Replikasi	Persen Inhibisi DPPH (%)				
	1 µg/ml	2 µg/ml	3 µg/ml	4 µg/ml	5 µg/ml
1	18,35	27,29	38,17	49,15	57,19
2	16,76	27,41	38,05	49,04	57,19
3	16,08	27,52	38,17	49,15	57,30
4	16,08	27,52	38,17	48,70	57,30
Rata-rata	16,82	27,44	38,14	49,01	57,25
SD	1,071	0,110	0,060	0,213	0,064

Tabel 3. Persen inhibisi serapan DPPH larutan FEDW

Replikasi	Persen Inhibisi DPPH (%)				
	10 µg/ml	20 µg/ml	30 µg/ml	40 µg/ml	50 µg/ml
1	23,40	38,68	52,44	74,20	87,45
2	18,54	38,17	52,64	71,67	86,95
3	23,20	39,39	52,34	71,26	87,96
4	17,94	33,42	52,54	68,93	87,86
Rata-rata	20,77	37,42	52,49	71,52	87,55
SD	2,933	2,710	0,129	2,159	0,460

Grafik hubungan konsentrasi larutan uji, sehingga diperoleh suatu kurva regresi linier. Kurva hasil uji aktivitas antioksidan FEDW dan rutin dari persen inhibisi dan konsentrasi dapat dilihat pada Gambar 2.

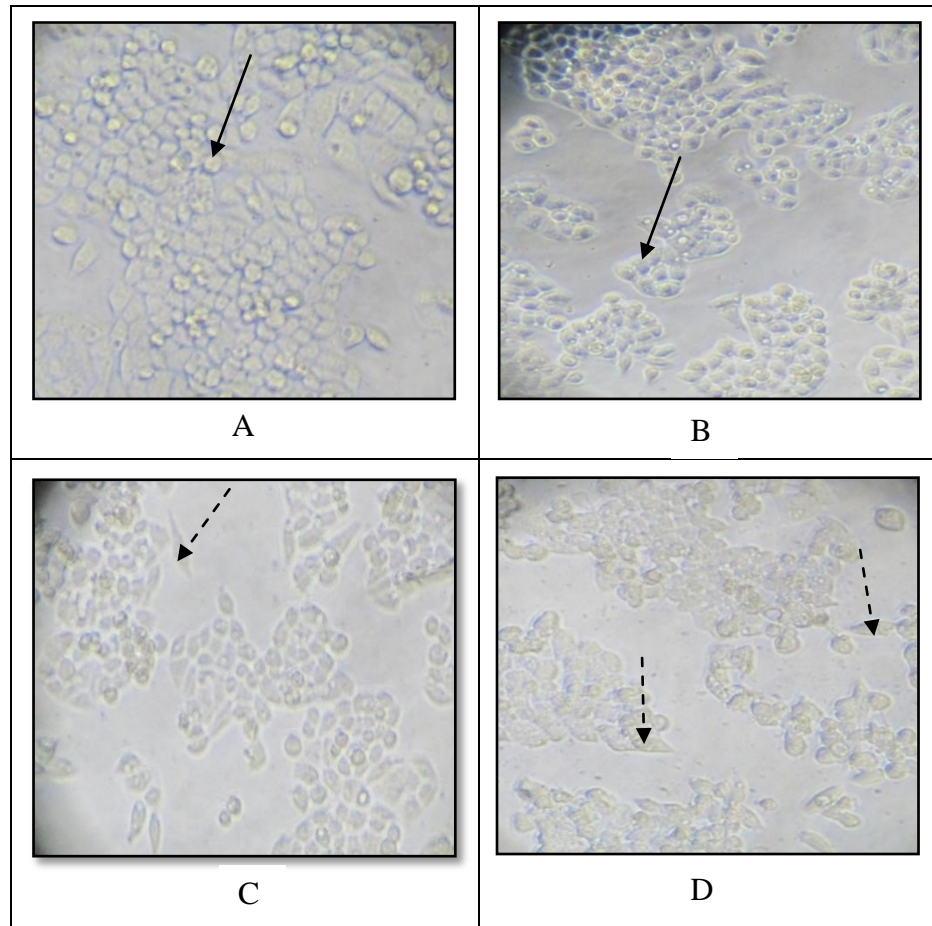
**Gambar 2.** Aktivitas antioksidan (A) Senyawa Rutin (B) FEDW

Dari persamaan regresi dapat dihitung nilai IC_{50} , fraksi etanol memiliki nilai IC_{50} sebesar 28 µg/ml. Menurut Mardawati, *et al.* (2008) hasil uji aktivitas antioksidan terlihat bahwa FEDW memiliki aktivitas antioksidan dengan kategori sangat kuat yang relatif lebih besar dari rutin yang memiliki IC_{50} sebesar 4 µg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa rutin sebagai kontrol positif memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibanding FEDW.

Uji Sitotoksik

Aktivitas sitotoksik FEDW terhadap sel HeLa dapat diamati dari perubahan morfologi sel HeLa setelah 24 jam perlakuan. Sel mengalami perubahan bentuk menjadi tidak bulat lagi dengan kepadatan lebih rendah

dibandingkan dengan kontrol sel dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Efek FEDW terhadap Sel HeLa.

A. Kontrol sel HeLa

B. Perlakuan FEDW kadar 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ terhadap sel HeLa

C. Perlakuan FEDW kadar 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ terhadap sel HeLa

D. Perlakuan FEDW kadar 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ terhadap sel HeLa

—→ Sel HeLa hidup

- - -→ Sel HeLa yang mati

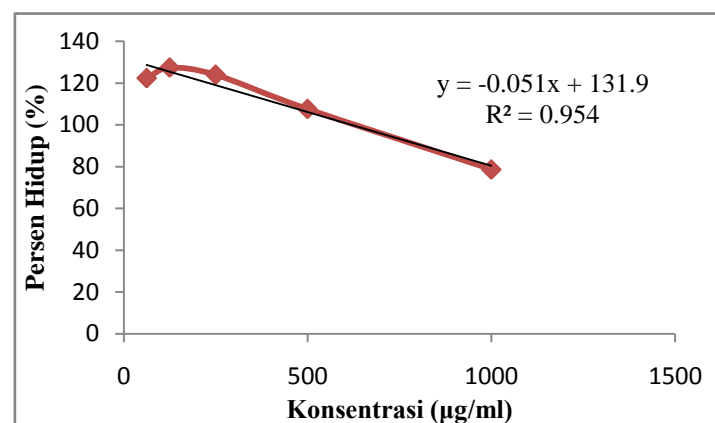
Berdasarkan Gambar 3(A) Kadar terendah FEDW yaitu 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, menunjukkan pada kontrol sel, sel HeLa tumbuh banyak, yang proliferasi sel dimana jumlah sel digambarkan sebagai bulatan-bulatan dengan perlakuan lebih banyak jernih, bergerombol. Pada Gambar 3(B) dibanding kontrol. Terlihat pada

Gambar 3(D), semakin bertambahnya kadar yaitu pada kadar 1000 $\mu\text{g/mL}$ kepadatan sel berkurang, terlihat sel semakin banyak yang tidak berbentuk bulat lagi ini menunjukkan bahwa sel lebih banyak yang mati. Nilai % hidup sel HeLa dengan pemberian FEDW dengan beberapa konsentrasi dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Persen Hidup Sel HeLa dengan berbagai konsentrasi FEDW

Replikasi	Persen Hidup Sel HeLa (%)				
	62,5 $\mu\text{g/ml}$	125 $\mu\text{g/ml}$	250 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$	1000 $\mu\text{g/ml}$
1	121,15	127,68	124,79	106,32	76,93
2	118,89	129,56	121,27	107,08	78,06
3	126,93	124,79	125,80	109,30	80,95
Rata – rata	122,32	127,34	123,95	107,57	78,65
SD	4,146	2,403	2,378	1,548	2,073

Grafik hubungan konsentrasi FEDW, sehingga diperoleh suatu kurva regresi linier. Kurva hasil uji aktivitas sitotoksik FEDW dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 1. Uji aktivitas sitotoksik FEDW

Dari persamaan regresi dapat dihitung nilai IC_{50} FEDW memiliki nilai IC_{50} sebesar 1605 $\mu\text{g/ml}$. Menurut Weerapreeyakul, *et al.* (2012) FEDW yang memiliki nilai IC_{50} sebesar 1605 $\mu\text{g/mL}$, mempunyai aktivitas sitotoksik

yang tergolong kurang toksik terhadap sel kanker serviks HeLa.

Molecular Docking

Nilai RMSD yang diperoleh sebesar 0,3111 yang berarti metode memiliki nilai validitas yang tinggi

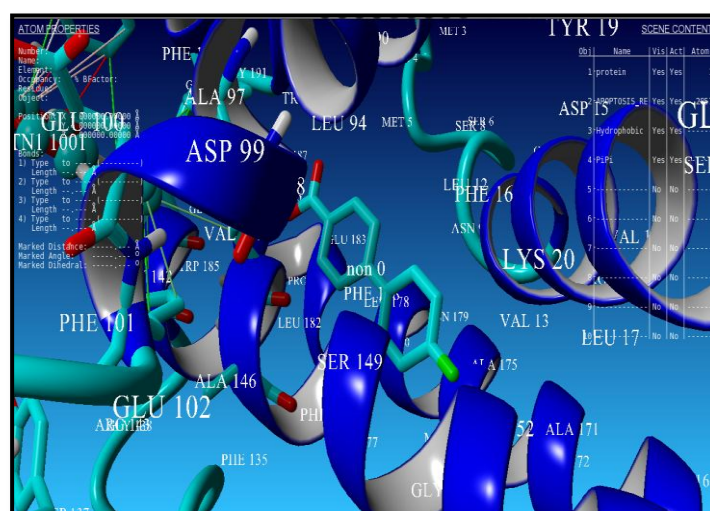
yang dibuktikan dengan nilai RMSD < 2, artinya posisi ligand copy mirip dengan native ligand. Hasil docking berupa score menggambarkan kekuatan ikatan paling stabil antara ligan dan reseptor yang dapat dilihat pada tabel 7

Tabel 1. *Score hasil docking native ligand dan ligan uji dengan Bcl-xl*

Ligand	Score docking terhadap Bcl-xl
<i>Native Ligand (4FC)</i>	-83,6148
Rutin	-91,210

Dari hasil *docking* yang memprediksi interaksi senyawa rutin dengan Bcl-xl terlihat bahwa rutin memperoleh *score* sebesar -91,210 yang memiliki *score* yang lebih rendah daripada ikatan Bcl-xl dengan *native ligand (4FC)*. Hal ini menunjukkan bahwa kompleks ikatan protein dengan

rutin masih lebih stabil (kuat) dibandingkan dengan kompleks antara protein dengan *native ligand* sehingga diprediksikan menyebabkan aktivitas inhibitor terhadap Bcl-xl lebih tinggi. Ikatan antara *native ligand* dan rutin dengan Bcl-xl dapat ditunjukkan pada gambar 14 dan 15.



PEMBAHASAN

Pemahaman tentang proses karsinogenesis merupakan pengembangan strategi dalam pengobatan kanker. Pendekatan terapi kanker menggunakan agen kemopreventif semakin berkembang terutama senyawa-senyawa berasal dari bahan alam dan memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Agen kemopreventif didefinisikan sebagai senyawa yang dapat menghambat dan menekan proses karsinogenesis pada manusia sehingga pertumbuhan kanker dapat dicegah. Daun waru mengandung senyawa flavonoid, dimana senyawa flavonoid merupakan senyawa yang paling banyak diteliti aktivitas kemoprevensinya (Chang *et al.*, 2001). Dengan adanya ketertarikan terhadap senyawa yang diduga mampu menghambat pertumbuhan sel kanker yaitu flavonoid mendasari pemilihan penyari yang digunakan untuk ekstraksi. Senyawa flavonoid dapat bersifat polar atau semipolar, sehingga digunakan etanol 70%. Penggunaan etanol 70% akan lebih efektif mengacu pada sifat polar etanol dalam mengekstrak senyawa flavonoid karena tingkat kepolaran etanol lebih rendah

dibandingkan air. Hal ini akan mengakibatkan dinding sel tumbuhan yang bersifat kurang polar lebih mudah didegradasi dan senyawa flavonoid akan lebih mudah keluar dari sel tanaman (Tiwari *et al.*, 2011). Usaha penemuan agen kemopreventif yang spesifik dan selektif dilakukan dengan fraksinasi untuk menyederhanakan senyawa metabolit sekunder yang terekstraksi untuk mengetahui senyawa aktif yang berperan sebagai kemopreventif.

Upaya untuk mengetahui mekanisme aksi FEDW sebagai agen kemopreventif harus diawali dengan identifikasi kandungan senyawa dalam fraksi tersebut. Identifikasi senyawa yang dilakukan dengan menggunakan KLT menunjukkan bahwa dalam FEDW mengandung flavonoid. Apabila dalam ekstrak terdapat senyawa flavonoid maka dapat diprediksi kemungkinan mekanisme penghambatan senyawa terhadap pertumbuhan kanker.

Pengujian aktivitas antioksidan FEDW memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat tetapi FEDW masih memiliki nilai IC_{50} yang lebih besar jika dibandingkan dengan

rutin sebagai pembandingnya yaitu 4 $\mu\text{g/mL}$. Ini dapat disebabkan karena rutin merupakan senyawa yang lebih murni dibandingkan dengan fraksi yang diuji. Adanya kandungan flavonoid pada FEDW berpotensi sebagai antioksidan. Aqil, *et al.* (2006) melaporkan bahwa flavonoid dari beberapa tanaman obat di India menunjukkan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Flavonoid yang kehilangan atom H akan menjadi radikal bebas baru tetapi karena adanya efek resonansi inti aromatik maka flavonoid menjadi tidak reaktif (stabil). Aktivitas penangkapan radikal bebas oleh senyawa antioksidan dapat dipantau dari berkurangnya intensitas warna ungu larutan DPPH. Pengurangan intensitas warna ungu dapat disebabkan oleh donasi hidrogen dari senyawa antioksidan kepada radikal DPPH sehingga terbentuk senyawa DPPHidrazin (stabil) berwarna kuning jika senyawa antioksidan tersebut adalah flavonoid. Flavonoid dapat menetralkan radikal bebas dengan memberikan elektronnya bagi radikal bebas penginisiasi terjadinya reaksi peroksidasi lipid.

Aktivitas radikal bebas hasil peroksidasi lipid akan menyebabkan banyak kerusakan patologis dimana akumulasi kerusakan akibat radikal bebas pada jaringan *in vivo* antara lain menyebabkan kanker, inflamasi dan aterosklerosis. Neoplasia serviks berhubungan dengan inflamasi berlebihan hasil dari stress oksidatif oleh ROS (*Reactive Oxygen Species*), dimana serangan ROS menyebabkan stres oksidatif (Singh *et al.*, 2007). Sehingga diharapkan dengan adanya substansi flavonoid pada FEDW dapat mencegah peroksidasi, dimana flavonoid yang bersifat lebih hidrofilik berinteraksi dengan bagian kepala yang bersifat polar dari lipid membran melalui ikatan hidrogen. Interaksi ini menyebabkan perlindungan membran bilayer dari serangan dari luar ataupun dari dalam misalnya oksidan (Oteiza *et al.*, 2005).

Aktivitas sitotoksik FEDW pada sel HeLa dapat dikatakan mempunyai aktivitas sitotoksik yang tergolong kurang toksik. Profil persen hidup sel HeLa menunjukkan adanya proliferasi dari sel HeLa yang cukup signifikan pada konsentrasi $\leq 500 \mu\text{g/ml}$. Hal ini dapat dilihat dari

persentase sel hidup akibat perlakuan yang lebih banyak dibandingkan kontrol sel. Hasil penelitian menunjukkan FEDW menyebabkan proliferasi sel dengan persen sel hidup sel HeLa sampai dengan 127,34%. Fenomena ini juga terjadi pada genistein, suatu fitoestrogen yang terdapat pada kedelai (Murkies *et al.*, 1998). Karakteristik dari senyawa fitoestrogen dapat memacu proliferasi sel pada konsentrasi rendah dan menghambat proliferasi sel pada konsentrasi tinggi atau biasa disebut efek bifasik (This *et al.*, 2001). Efek proliferasi FEDW dimungkinkan karena terdapat senyawa dalam FEDW yang dapat berikatan dengan ER (*Estrogen Receptor*) dan membentuk kompleks fitoestrogen-ER sehingga terjadi pengaktifan reseptor estrogen. Reseptor estrogen yang telah aktif akan berinteraksi dengan ERE (*Estrogen Response Element*) yang terdapat dalam nukleus sehingga mampu menginduksi ekspresi *estrogen responsive gene*, salah satunya adalah protein c-Myc. Protein c-Myc yang terekspresi akan memicu terjadinya daur sel dan meningkatkan proliferasi sel-sel epitelial payudara dan sel-sel

uterus (Gruber *et al.*, 2002). Adanya cincin fenol sangat diperlukan untuk berikatan pada sisi ikatan reseptor estrogen yang merupakan struktur kunci yang membuat fitoestrogen dapat berikatan dengan ER dan memperlihatkan efek estrogenik (Yildiz, 2005). Salah satu contoh fitoestrogen adalah senyawa flavonoid yang banyak terdapat dalam tumbuh-tumbuhan. Kemungkinan besar kandungan flavonoid pada FEDW mampu berinteraksi dengan reseptor estrogen sehingga dapat meningkatkan proliferasi sel.

Dilain sisi pada konsentrasi tinggi 1000 µg/ml FEDW menunjukkan penghambatan proliferasi sel dengan persen hidup sel HeLa sebesar 78,6%. Hal tersebut menunjukkan bahwa FEDW memiliki efek toksik terhadap pertumbuhan sel HeLa. Efek sitotoksik FEDW akan menyebabkan sel HeLa mati yang ditandai dengan perubahan permeabilitas membran sel HeLa. Semakin tinggi konsentrasi FEDW, perubahan permeabilitas membran sel HeLa yang terjadi semakin besar. Berdasarkan penelitian Murkies, *et al.* (1998) diketahui bahwa fitoestrogen

pada kadar rendah menunjukkan efek estrogenik sedangkan pada kadar tinggi menunjukkan efek antiestrogenik sehingga mampu menekan pertumbuhan sel kanker. Pada konsentrasi tinggi FEDW menunjukkan penghambatan proliferasi sel HeLa, kemungkinan aksi penghambatannya dapat bermacam-macam. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa mekanisme penghambatan proliferasi dengan menghambat enzim topoisomerase II, menghambat aktivitas tirosin kinase, melalui aktivitas antioksidan, induksi apoptosis, induksi penghambatan siklus sel dan inhibisi angiogenesis (Liu *et al.*, 2005). Penelitian Shen, *et al.* (1999) menyebutkan bahwa genistein yang tergolong fitoestrogen mampu menghambat aktivitas tirosin kinase, sehingga kemungkinan aksi penghambatan pertumbuhan oleh FEDW juga dengan menghambat aktivitas tirosin kinase.

Mekanisme penghambatan proliferasi yang mungkin lainnya adalah yaitu melibatkan penghambatan proses prooksidan yang menyebabkan promosi tumor. Secara umum dipercaya bahwa pembentukan *growth*

promoting oxidant (ROS (*Reactive Oxygen Species*)) merupakan katalis utama pada tahap promosi dan progresi yang mengikuti tahap inisiasi. Sifat antioksidan dari senyawa flavonoid dapat menghambat proses karsinogenesis. Fase inisiasi kanker seringkali diawali melalui oksidasi DNA yang menyebabkan mutasi oleh senyawa karsinogen (Kakizoe, 2003). Karsinogen aktif seperti radikal oksigen, peroksida dan superoksida, dapat distabilkan oleh flavonoid melalui reaksi hidrogenasi maupun pembentukan kompleks (Ren *et al.*, 2003).

Salah satu jalur mekanisme lain yang mungkin terjadi adalah melalui induksi apoptosis. Apoptosis merupakan kematian sel yang diprogram sebagai respon terhadap rangsangan tertentu. Senyawa flavonoid telah diketahui dapat menginduksi terjadinya apoptosis tetapi mekanisme molekulernya belum diketahui secara pasti (Ren *et al.*, 2003). Apoptosis merupakan metode yang penting untuk kontrol seluler dan gangguan pada proses ini mengakibatkan pertumbuhan sel yang tidak normal (kanker) (Taraphdar,

2001). Mekanisme flavonoid dalam menginduksi apoptosis dapat melalui *down-regulation* ekspresi Bcl-2 dan Bcl-xl dan *up regulation* ekspresi Bax dan Bak (Konig *et al.*, 1997). Apoptosis dikontrol oleh protein Bcl-2 *family*. Beberapa anggota dari family ini antara lain Bcl-2 dan Bcl-xl sebagai protein antiapoptosis, sedangkan Bax, Bak, Bad dan Bid merupakan protein pro apoptosis.

Dalam rangka pengembangan senyawa kemopreventif dengan target aksi yang spesifik, maka selanjutnya diperlukan kajian dan penelusuran mekanisme aksi secara molekuler. Senyawa di dalam FEDW yang diduga mempunyai efek penurunan insidensi kanker adalah senyawa golongan flavonoid. Salah satu senyawa flavonoid yang terkandung di dalam daun *Hibiscus tiliaceus* adalah rutin (Zhen *et al.*, 2008). Aktivasi onkogen yang diekspresikan oleh sel kanker serviks yang diinfeksi HPV seperti E6 dan E7 menyebabkan terjadinya perubahan *epigenetic*. Dimana onkogen E6 dan E7 menghasilkan peningkatan ekspresi protein Bcl-xl (Aungsumart *et al.*, 2007). Ekspresi berlebihan Bcl-2 dan Bcl-xl diketahui menghambat

aktivitas pro-apoptosis dari Bax (Theopilus *et al.*, 2012). Adanya protein proapoptosis seperti Bad dan Bax menyebabkan apoptosis sel, sedangkan apoptosis dihambat oleh protein antiapoptosis seperti Bcl-xl. Oleh karena itu, target penting dalam pengobatan kanker adalah penekanan ekspresi protein antiapoptosis. Penghambatan pertumbuhan kanker oleh protein antiapoptosis yang berperan penting dalam *signal* apoptosis sel salah satunya Bcl-xl.

Penghambatan protein antiapoptosis seperti Bcl-xl menyebabkan peningkatan ekspresi Bax. Bax yang mengalami stimulasi akan mengalami translokasi ke mitokondria dan membentuk saluran pada membran mitokondria menyebabkan pelepasan sitokrom c. Pelepasan sitokrom c mencetuskan pertemuan Apaf-1 (*Apoptosis protease-activating factor*) dan *pro-caspase 9* untuk membentuk suatu apoptosome. ATP dibutuhkan untuk rekrutmen *pro-caspase 9* oleh Apaf-1 melalui apa yang disebut CARD (*caspase recruiting domain*). Kemudian *pro-caspase 9* secara autolitik dipecah menjadi *caspase 9* aktif, yang

kemudian mengaktivasi *pro-caspase 3* menjadi *caspase* aktif yang menghasilkan pemecahan substrat dan apoptosis (Chao *et al.*, 1998).

Hal ini dapat dibuktikan melalui *docking* yang membuktikan bahwa flavonoid rutin mampu berikatan dengan Bcl-xl dengan energi yang lebih rendah dari *native ligand* yaitu sebesar -91,210. Dengan demikian dimungkinkan ligan uji memiliki kemampuan menghambat aktivitas Bcl-xl. Oleh karena itu senyawa rutin dalam FEDW melalui penelitian ini dapat mengurangi insidensi kanker pada sel HeLa dengan menginduksi apoptosis melalui mekanisme penghambatan protein Bcl-xl. Mukherjee, *et al.* (2010) membuktikan bahwa penghambatan protein anti apoptosis dari Bcl-2 *family* sebagai target intervensi untuk pengembangan terapi kanker. Dimana interaksi dengan protein anti apoptosis Bcl-2 *family* seperti Bcl-xl menjadi penting untuk aktivitas kematian dalam sel. Lebih lanjut hal ini dibuktikan oleh Mohammad, *et al.* (2005) bahwa

molekul kecil yang berinteraksi dengan Bcl-xl akan berfungsi sebagai antagonis Bcl-xl dan akan mempromosikan apoptosis.

Berdasarkan penelitian diatas dapat dilihat bahwa FEDW cukup prospektif untuk dikembangkan sebagai agen kemopreventif. Dikarenakan memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat dimana flavonoid diduga bertanggung jawab atas efek kemopreventif yang ditimbulkan. Pengkombinasian FEDW dengan agen kemoterapi diharapkan memberikan hasil yang baik untuk melihat efikasi kombinasi keduanya terhadap penghambatan pertumbuhan sel kanker, yaitu apakah sinergis, aditif, atau antagonis. Mekanisme penghambatan pertumbuhan sel kanker HeLa sendiri tidak diteliti dalam penelitian ini, sehingga belum diketahui secara pasti mekanisme penghambatan FEDW terhadap sel HeLa. Kemungkinan mekanisme kemopreventif dari senyawa tersebut masih harus dibuktikan secara ilmiah menggunakan metode yang spesifik.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan terhadap FEDW dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. FEDW mengandung senyawa golongan flavonoid.
2. FEDW memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat dengan nilai IC_{50} sebesar 28 $\mu\text{g/ml}$.
3. FEDW memiliki aktivitas sitotoksik melalui penghambatan pertumbuhan terhadap sel kanker serviks HeLa dengan nilai IC_{50} sebesar 1605 $\mu\text{g/ml}$.
4. Senyawa rutin memiliki potensi yang kuat dalam menginduksi apoptosis melalui penghambatan protein Bcl-xl secara *molecular docking* dengan *score docking* sebesar -91,210.

SARAN

1. FEDW dapat diteliti lebih lanjut dengan mengisolasi senyawa

DAFTAR PUSTAKA

- World Health Organization (WHO)/Institut Català d'Oncologia (ICO), 2010, Malaysia: Human Papillomavirus and Related Cancers, Summary Report. Third Edition. WHO/ICO Information Centre.
- Jiang, Q., Wong, J., Fyrst H., Saba, J.D., Ames, B.N., 2004, γ -Tocopherol or Combinations of Vitamin E Forms Induce Cell Death in Human Prostate Cancer Cells by Interrupting Sphingolipid Synthesis, *PNAS.*, 101 (51): 17825-17830.
- Chen, J.J., Huang, S.Y., Chang, D.Y., Chen, I.S., Wang, T.C., Fang, H.Y., 2006, A New Cytotoxic Amide from the Stem Wood of *Hibiscus tiliaceus*, *Planta Medica*, 72: 935-938.
- Oba, K., Teramukai, S., Kobayashi, M., Matsui, T., Kodera, Y., Sakamoto, J., 2007., Efficacy of adjuvant immunochemotherapy with polysaccharide K for patients with curative resections of gastric cancer, *Cancer Immunol. Immunother.* 56(6): 905–911.
- Uddin, S. J., Grice, D., Trialonggo, E., 2011, Cytotoxic Effects of Bangladeshi Medicinal Plant Extract. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-7.
- Meiyanto, E., Susilowati, S., Tasminatun, S., Murwanti, R., Sugiyanto., 2007, Efek

flavonoid sehingga dapat diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel kanker serviks HeLa.

2. Pengembangan lebih lanjut, perlu dilakukan penelitian dengan kajian yang lebih luas mengenai penggunaan bersama tanaman daun waru sebagai agen kemopreventif dengan obat-obat sitostatika pada terapi kanker.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai uji selektivitas terhadap sel normal untuk mengetahui keamanan dari FEDW.
4. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme penghambatan FEDW terhadap sel HeLa misalnya melalui uji pemacuan apoptosis atau uji antiproliferasi terhadap sel kanker seviks HeLa.

- kemopreventif ekstrak *Gynura procumbens* (Lour), Merr pada karsinogenesis kanker payudara tikus, *Majalah Farmasi Indonesia*, 18(3): 154-161.
- Koda, T., Kurod, Y., Imai, H., 2008, Protective effect of rutin against spatial memory impairment induced by trimethyltin in rats, *Nutr Res*, 28: 629–634.
- Mardawati, E., Filian, F., dan Marta, H., 2008, Kajian aktivitas antioksidan ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.) dalam rangka pemanfaatan limbah kulit manggis di Kecamatan Puspahiang Kabupaten Tasikmalaya. Penelitian Staf Pengajar Jurusan Teknologi Industri Pangan Fakultas Teknologi Industri Pertanian Universitas Padjadjaran.
- Weerapreeyakul, N., Nonpunya, A., Barusrux, S., Thitimetharoch, T., Sripanidkulchai, B., 2012, Evaluation of the anticancer potential of six herbs against a hepatoma cell line, *Chinese Medicine*, 7(15):1-7.
- Chang, L.C., Kingdom, A.D., 2001, Flavonoid as Cancer Chemopreventive Agents, in: Trigali, C., Bioactive Compounds from Natural Sources, Isolation, Characterisation and Biological Properties, Taylor & Friends, New York.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, G., Kaur, H., Kaur, M., 2011, Phytochemical screening and extraction : A review, *J Int Pharm Sci*, 1: 98-106.
- Aqil, F., Ahmad, I., Mehmood, Z., 2006, Antioxidant and Free Radical Scavenging Properties of Twelve Traditionally Used Indian Medicinal Plants, *Turk J Biol* 30: 177-183.
- Oteiza, P.I., A.G. Erlejman, S.V., Verstraeten, C.L., Keen, and Fraga, C.G., 2005, Flavonoid-membrane interactions: A protective role of flavonoids at the membrane surface, *Clin. & Dev. Immunol*, 12(1): 19-25.
- Murkies, A.L., Wilcox, G., and Davis, S.R., 1998, Phytoestrogens, *J Clin Endocrinol Metab*, 83: 297-303.
- This, P., A De la Rocfordiere, Clough, K.,A, Fourquet, and Magdalenat, H., 2001, Phytoestrogens After Breast Cancer, *Endocrine-Related-Cancer*, 8: 129-134.
- Yildiz, Fatih, 2005, *Phytoestrogens in Functional Foods*, Taylor & Francis Ltd., pp. 3-5, 210-211.
- Liu, B., Edgerton, S., Yang, X., Kim, A., Ordonez-Ercan, D., Matson, T., Alvarez, K., McKimmey, C., Liu, N., and Thor, A., 2005, Low dose Dietary Pytoestrogens Abrogates Tamoxifen-Associated Mammary Tumor Prevention, *Cancer Res*, 65: 879-886.
- Shen, F., Xue, X., and Weber, G., 1999, Tamoxifen and Genistein Synergistically Down-Regulate Signal Transduction and Proliferation in Estrogen Receptor-Negative-Human Breast Carcinoma MDA-MB-435 Cells, *Anticancer Res*, 19: 1657-1662.
- Kakizoe, 2003, Chemoprevention of cancer Focusing on Clinical Trials, *Jpn J. Clin. Oncol*, 33(9): 421-442.
- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., Zhang, L., 2003, Flavonoids: Promising Anticancer Agents,

- Medicinal Research Review*, 23(4): 519-534.
- Taraphdar, A.K., Roy, M., and Bhattacharya, R. K., 2001, Natural products as inducer of apoptosis: Implication for cancer therapy and prevention, *Current Science*, 80, 11: 1387-1392.
- Konig, A., Schwartz, G.K., Mohammad, R.M., Al-Katib, A., Gabrilove, J.L., 1997, The novel cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol downregulates Bcl-2 and induces growth arrest and apoptosis in chronic B-cell leukemia lines, *Blood*, 90: 4307-4312.
- Zhen, J., Qi, Y., Chin, K., Siwon, J.E., Wu, Q.L., 2008, Polyphenols from Hibiscus Leaf: Promising New Source of Antioxidants, the New Use Agriculture and Natural Plant Products Program and RUTGERS.
- Aungsumart S., Vaeteewoottacharn, K., Chamutpong, S., and Ponglikitmongkol, M., 2007, Chemo-radio Resistance in Cervical Cancer Induced by HPV16 E7, *Science Asia.*, 33: 5-11.
- Theopilus, W., Watuguly., Tjahjono., Martha, K., Syahran, W., 2012, Induksi Polifenol Mahkota Dewa dan Apoptosis Sel Kanker Paru Mencit Strain Balb/C: Analisis pada *Up-Regulation* dan *Down-Regulation* Bcl-2, *M Med Indones*, 46: 33-43.
- Chao, D.T., Korsmeyer, S.J., 1998, Bcl-2 family: regulator of cell death. *Annual Rev, Immunol*, 16: 395-419.
- Mohammad, R.M., Wang, S., Aboukameel, A., Chen, B., Wu, X., Chen, J., Al-Katib, A., 2005, Preclinical studies of a nonpeptidic small-molecule inhibitor of Bcl-2 and Bcl-X(L) [(-)-gossypol] against diffuse large cell lymphoma, *Molecular Cancer Therapeutics*, 4: 13-21.
- Mukherjee, P., Desai, P., Zhou, Y.D., Avery, M., 2010, Targeting the BH3 domain mediated protein – protein interaction of Bcl-xL through virtual screening, *Journal of chemical information and modeling*, 50(5): 906-923.