

**EFFECTIVENESS OF ETHANOLIC EXTRACT OF PERIWINKLE LEAVES
(*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) ON APOPTOSIS
INDUCTION OF RAJI CELLS *In Vitro***

**EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN TAPAK DARA (*Catharanthus roseus* (L.)
G. Don) TERHADAP INDUKSI APOPTOSIS
PADA SEL RAJI *In Vitro***

Sofiah¹, Ana Medawati²
Mahasiswa PSPDG FKIK UMY¹, Dosen PSPDG FKIK UMY²

ABSTRACT

*Head and neck cancer is one of the cancer with a high number of incidence that is classified based on the site such as nasopharing, oral cavity, tongue, salivary gland and sinus. The main causes of head and neck cancer are alcohol and tobacco use and virus exposure. Periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) is one of the plants that can be used as an anticancer because it contains with vincristine, vinblastine and flavonoid. The purpose of this study is to test the effectiveness of ethanolic extracts of periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) leaves on apoptosis induction of Raji cells.*

*The method of this study is a pure laboratory experiment with apoptosis testing using double staining method with ehtidium bromide-acridine orange. Raji cells were given with six different .concentration of ethanolic extracts of periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) leaves which were 0 µg/ml, 1,56 µg/ml, 3,125 µg/ml, 6,25 µg/ml, 12,5 µg/ml dan 25 µg/ml. Cell counting using one way ANOVA.*

*The result of this study is that ethanolic extract of periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) leaves were effective on inducing apoptosis of Raji cells in 6,25 µg/ml with the average of apoptosis cells is 128.60± 31.07 and the conclusion is ethanolic extract of periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) leaves were effective on inducing apoptosis of Raji cells.*

Keywords: *Cancer, head and neck cancer, Raji cells, periwinkle leaves, (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don), apoptosis.*

Abstrak

Kanker kepala dan leher adalah salah satu kanker dengan angka kejadian yang cukup besar dengan beberapa pembagian sesuai dengan tempatnya yaitu nasofaring, rongga mulut, lidah, kelenjar ludah dan sinus. Penyebab utamanya adalah konsumsi alkohol, tembakau dan terpaparnya sel terhadap virus. Tapak Dara (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) merupakan salah satu tanaman yang dapat berfungsi sebagai zat antikanker karena adanya senyawa vinkristin, vinblastin dan flavonoid. Tujuan dari penelitian ini adalah ntuk mengetahui

efektifitas ekstrak etanol daun tapak dara (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) terhadap induksi apoptosis sel Raji.

Metode yang digunakan eksperimen laboratories murni dengan uji apoptosis menggunakan metode *double staining* yaitu pengecatan sel menggunakan *Ethidium bromide-acridine orange*. Sel Raji diberi perlakuan dengan enam konsentrasi ekstrak etanol daun tapak dara yaitu 0 µg/ml, 1,56 µg/ml, 3,125 µg/ml, 6,25 µg/ml, 12,5 µg/ml dan 25 µg/ml. Perhitungan sel yang mengalami apoptosis menggunakan mikroskop *fluorescence*. Analisis data menggunakan *one way ANOVA*.

Hasil penelitian efektivitas ekstrak etanol daun tapak dara (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) efektif dalam menginduksi apoptosis sel Raji dengan konsentrasi 6,25 µg/ml dengan rata-rata sel yang mengalami apoptosis sebesar 128.60± 31.07. Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak etanol daun tapak dara (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) efektif dalam menginduksi apoptosis sel Raji (p<0,05).

Kata kunci: Kanker, kanker kepala dan leher, sel Raji, daun tapak dara, (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don), apoptosis.

PENDAHULUAN

Kanker adalah istilah yang digunakan untuk suatu penyakit dimana sel-sel membelah tanpa kontrol dan dapat menyerang jaringan lainnya. Sel kanker dapat menyebar ke bagian lain dalam tubuh melalui pembuluh darah dan limfonodi¹.

Kanker menjadi salah satu penyebab kematian di dunia dengan insidensi kurang lebihnya 14 juta kasus baru dan 8,2 juta kematian terjadi karenanya pada tahun 2012².

Prevalensi penyakit kanker di Indonesia pun cukup tinggi yaitu 1,4 per 1000 penduduk, atau sekitar 330.000 orang. Kanker tertinggi di Indonesia pada perempuan adalah kanker payudara dan kanker leher rahim, sedangkan pada laki-laki adalah kanker paru dan kanker kolorektal³.

Ada berbagai macam tipe kanker, beberapa diantaranya adalah kanker tulang, kanker otak, kanker payudara, kanker serviks, kanker mata, leukemia, kanker rongga mulut

dan orofaring dan kanker kepala dan leher⁴. Kanker kepala dan leher adalah semua tumor benigna, premaligna, dan maligna yang terdapat di atas ketinggian klavikula kecuali tumor-tumor otak dan *medulla spinalis*. Beberapa contoh dari kanker kepala dan leher adalah tumor kelenjar parotidea, kelenjar submandibularis, kelenjar tiroidea dan kelenjar limfe atau limfoma maligna⁵.

Sel raji atau sel *Burkitt's Lymphoma* adalah salah satu sel kanker yang ditemukan oleh Denis Parsons Burkitt dimana etiologinya dihubungkan oleh infeksi virus *Epstein-Barr*⁶. Kanker *Burkitt's Lymphoma* menjadi penyebab kematian utama pada anak-anak dengan rata-rata usia 6,69 tahun di Uganda dan sub-Sahara Afrika dengan kasus sebesar 1217 pada tahun 1985 hingga 2005⁷.

Adapun berbagai terapi kanker adalah pembedahan, radioterapi, kemoterapi, pembedahan - radioterapi, pembedahan - kemoterapi dan radioterapi - kemoterapi, terapi radiasi, terapi bertarget, terapi imun, terapi hipertermia, terapi fotodinamik, terapi laser, transplantasi sel stem dan transfusi darah⁴.

Banyak tanaman yang telah diteliti memiliki potensi sebagai pengobatan penyakit seperti ubi jalar, sambiloto dan tapak dara yang terbukti dapat digunakan sebagai antikanker dengan cara menghambat pertumbuhan kanker maupun menginduksi kematian sel kanker.

Tanaman tapak dara (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) adalah semak tahunan yang telah lama dibudayakan oleh masyarakat Indonesia sebagai tanaman hias dan tanaman obat⁸. Tanaman ini sudah

dikenal di dalam pengobatan tradisional dalam penurunan kadar gula darah namun pada pemeriksaan selanjutnya menunjukkan aktivitas antikanker⁹.

Apoptosis berasal dari bahasa Yunani yang berarti gugur, mengarah pada gugurnya daun dari pohonnya di musim gugur. Istilah apoptosis digunakan untuk mendeskripsikan kematian sel yang terprogram dan merupakan komponen yang normal dalam makhluk hidup untuk menjaga keseimbangan perkembangan dan pemeliharaan kesehatan dalam organisme multiseluler¹⁰.

Apoptosis berbeda dengan nekrosis dimana nekrosis adalah proses yang terjadi ketika adanya kematian sel yang diakibatkan oleh luka akut seperti pembengkakan dan luka bakar yang berhubungan dengan hilangnya integritas sel. Sel yang mengalami nekrosis dapat

mensekresi isinya, menyebabkan peradangan dan perlukaan kepada sel-sel sekitarnya¹¹.

Berdasarkan uraian di atas, maka penting dilakukan penelitian mengenai uji efektivitas ekstrak etanol daun tapak dara (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) terhadap induksi apoptosis pada sel raji.

BAHAN DAN CARA

1. Pembuatan ekstrak etanol daun tapak dara (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don).

Daun Tapak Dara (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) dengan berat total 2 kg diseleksi, dicuci hingga berat total daun tapak dara basah adalah 31,32 gram yang selanjutnya dipotong-potong, kemudian dikeringkan dalam almari pengering pada suhu 45°C selama 48 jam dan

dijadikan serbuk menggunakan mesin penyerbuk hingga halus. Pembuatan ekstrak menggunakan metode maserasi, yaitu dengan merendam 372,15 gram bubuk daun tapak dara (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) dalam 3000 ml etanol 85% dan dibuat stok 1 gr/ml lalu selanjutnya dibuat konsentrasi 0 µg/ml, 1,56 µg/ml, 3,125 µg/ml, 6,25 µg/ml, 12,5 µg/ml dan 25 µg/ml.

2. Persiapan biakan sel Raji

Sel Raji dibiakkan dalam flask yang berisi larutan RPMI-1640, FBS 10% dan penisilin-streptomisin 1% dalam cawan petri dengan diameter 100 mm. Sel diinkubasi pada suhu 37° C dengan kelembaban udara 95% dan CO₂ 5%. Setelah itu, lakukan perhitungan sel yang dibutuhkan dengan menggunakan bilik hitung dan didapatkan hasil sel yang diperlukan adalah 1×10^5 sel/well.

3. Uji Apoptosis

Sel raji dibiakkan dalam *cover slip* diameter 13 mm. *Cover slip* diletakkan pada plat 24 berdiameter 60 mm dan transfer sel kedalam sumuran dengan mikropipet sebanyak 1×10^5 sel/well. Kemudian dilakukan *treatment* dengan pemberian RPMI-1640 yang mengandung berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun tapak dara, yaitu 0 µg/ml, 1,56 µg/ml, 3,125 µg/ml, 6,25 µg/ml, 12,5 µg/ml dan 25 µg/ml. kemudian dimasukkan ke dalam inkubator selama 24 jam. Setelah itu dilakukan pengecatan menggunakan *acridine orange* dan *etidium bromide* lalu amati sel dengan menggunakan mikroskop *flouresence*, kemudian hitung sel yang mengalami apoptosis. Sel yang mengalami apoptosis akan berwarna orange atau kekuningan, sel yang mengalami nekrosis berwarna merah

sedangkan sel yang tidak mengalami apoptosis berwarna hijau.

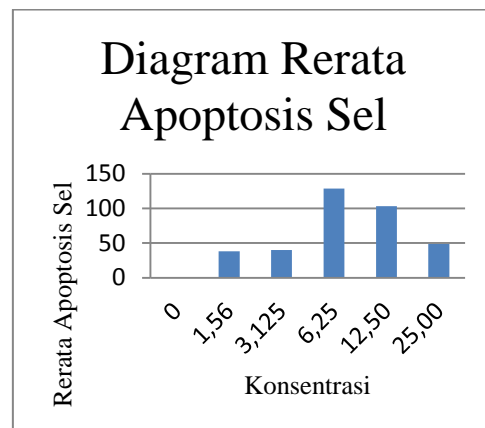
HASIL PENELITIAN

Tabel 1. Rerata dan Simpangan Baku

Konsentrasi Perlakuan ($\mu\text{g/ml}$)	Rata-rata \pm Standard Deviasi
0	.00
1.56	38.00 ± 9.41
3.125	39.80 ± 7.43
6.25	128.60 ± 31.07
12.5	103.20 ± 40.59
25	48.60 ± 14.77
Total	68.88 ± 45.35

Berdasarkan Tabel 1. diketahui bahwa rerata sel dan simpangan baku yang mengalami apoptosis meningkat mulai dari konsentrasi 1.56 $\mu\text{g/ml}$ yang mempunyai rerata sel mengalami apoptosis sebesar 38.00 ± 9.41 hingga puncaknya ada pada konsentrasi 6.25 $\mu\text{g/ml}$ dengan nilai rerata sel yang mengalami apoptosis sebesar 128.60 ± 31.07 . Selanjutnya rerata sel yang mengalami apoptosis mulai menurun pada konsentrasi

12.5 $\mu\text{g/ml}$ yang memiliki rerata sel yang mengalami apoptosis sebesar 103.20 ± 40.59 dan pada konsentrasi 25 $\mu\text{g/ml}$ memiliki rerata sel yang mengalami apoptosis sebesar 48.60 ± 14.77 .



Gambar 1. Rerata jumlah apoptosis sel setelah diberi perlakuan dengan berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun tapak dara (*Catharanthus Roseus* (L.) G. Don).

Berdasarkan gambar grafik di atas, diketahui bahwa rerata sel yang mengalami apoptosis dengan jumlah tertinggi ada pada konsentrasi 6,25 $\mu\text{g/ml}$ sebesar 128.60.

Tabel 2. Hasil Uji Statistik

Normalitas *Saphiro-Wilk*

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	df	Sig./P
0	5	0
1.56	5	.421
3.125	5	.356
6.25	5	.879
12.5	5	.366
25	5	.763

Berdasarkan Tabel 2. diketahui bahwa hasil dari uji normalitas *Shapiro Wilk* memiliki signifikansi (p) lebih dari 0,05 ($p > 0,05$), sehingga dapat dikatakan bahwa semua perlakuan memiliki data yang terdistribusi normal.

Tabel 1. Tes Homogenitas Variansi

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
11.239	5	24	.000

Dari Tabel 3. dapat disimpulkan bahwa angka signifikansi yang didapat yaitu 0.000 diartikan normal karena $P < 0.05$ sehingga data tersebut memiliki variansi yang sama. Untuk menilai

tingkat signifikansi dari data apoptosis sel raji, selanjutnya dilakukan uji parametrik *One Way ANOVA*.

Tabel 2. Hasil Uji *One Way ANOVA*

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<i>Between Groups</i>	60882.167	5	12176.433	55.996	0.000
<i>Within Groups</i>	5218.800	24	217.450		
<i>Total</i>	66100.967	29			

Tabel 4. di atas menunjukkan bahwa nilai signifikansi dari hasil Uji *One Way ANOVA* adalah .000 dimana $P < 0.05$ untuk Uji *One Way ANOVA* memiliki arti bahwa terdapat perbedaan yang signifikan dari masing-masing konsentrasi ekstrak etanol daun tapak dara dalam induksi apoptosis dari sel raji.

Perbedaan rerata antara masing-masing konsentrasi dari ekstrak etanol daun tapak dara, (*Catharanthus Roseus* (L.) G. Don) dapat diketahui dengan uji *Post Hoc*

menggunakan LSD (*Least Significant Different*). Hasil dari uji LSD menunjukkan bahwa nilai –nilai $p < 0,005$ sehingga data tersebut memiliki perbedaan yang bermakna antara masing-masing konsentrasi.

DISKUSI

Kanker adalah istilah yang digunakan untuk suatu penyakit dimana sel-sel membelah tanpa kontrol dan dapat menyerang jaringan lainnya.

Tanaman tapak dara (*Catharanthus Roseus* (L.) G. Don) adalah salah satu tanaman yang mengandung berbagai macam alkaloid yang dapat diekstrak diantaranya adalah *vinblastine*, *vincristine*, *leurosine*, dan *leurosidine* yang memiliki sifat antimitosis dan antikanker.

Apoptosis adalah *programmed cell death*, terjadi

secara normal selama proses perkembangan dan penuaan sebagai mekanisme homeostatik untuk memelihara populasi sel dan jaringan.

Hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun tapak dara (*Catharanthus Roseus* (L.) G. Don) efektif dalam menginduksi apoptosis sel raji pada konsentrasi tertentu yaitu 6,25 $\mu\text{g/ml}$ dengan rata-rata sel yang berapoptosis adalah 128.60 ± 31.07 sejalan dengan beberapa senyawa lainnya seperti Wagonin yang diambil dari akar tumbuhan *Scutellaria baicalensis* yang memiliki potensi yang baik sebagai terapi kanker khususnya *Burkitt's Lymphoma* jika dikombinasikan dengan sistem kerja *magnetic nanoparticles* dan senyawa *Andrographolide* dari tumbuhan sambiloto (*Andrographis paniculata*)

yang juga memiliki potensi yang baik sebagai antikanker dengan menginduksi apoptosis yang tergantung pada spesies oksigen reaktif pada sel turunan limfoma dan sel tumor primer (Yang *et al.*, 2010)

KESIMPULAN

Hasil dari penelitian ini membuktikan bahwa ekstrak etanol daun tapak dara (*Catharanthus Roseus* (L.) G. Don) efektif meningkatkan apoptosis sel raji.

SARAN

Sehubungan dengan penelitian yang dilakukan secara *in vitro* ini maka perlu dilakukan penelitian secara *in vivo* sebelum diujicobakan ke manusia, perlu pula dilakukan penelitian terkait senyawa-senyawa aktif spesifik yang terkandung dalam daun tapak dara (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don)

serta pengaruh ekstrak etanol dari tumbuhan lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

1. <http://www.cancer.gov/cancertopics/what-is-cancer> (*National Cancer Institute*) diakses pada tanggal 14 Februari 2015 pukul 20.12 WIB, *updated* pada tanggal 9 Februari 2015.
2. <http://www.who.int/cancer/en/> (*World Health Organization*) diakses pada tanggal 14 Februari 2015 pukul 21.02 WIB, *updated* 2015.
3. www.riskesdas.litbang.depkes.go.id/ (*Riset Kesehatan Dasar*) diakses pada tanggal 16 Februari 2015 pukul 18.00 WIB, *updated* pada tanggal 20 Januari 2015.
4. <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/> (*American Cancer Society*) diakses pada tanggal 20 Februari 2015 pukul 15.38 WIB, *updated* pada tanggal 15 Februari 2015.

5. Velde C.J.H van de., Bosman F.T., Wagener D.J.Th. (1996). *Onkologi. Gadjah Mada University Press*, 10-249.
6. Saini N.S., Gujral G.S., Tripathi M., Sharma R., Kumar P., Saw S., Mondal A., Tripathi R.P. (2009). *Burkitt's Lymphoma with Leptomeningeal Metastasis: Demonstration by FDG-PET and MRI. European Journal of Radiology Extra* 69, e5-e8.
7. Otmani N. & Khattab M. (2008). *Oral Burkitt's Lymphoma in Children: the Moroccan Experience. International Journal of Oral Maxillofacial Surgery* 37, 36-40.
8. Kentjono WA. Pengaruh vaksinasi BCG dalam meningkatkan respons T helper 1 (Th1) dan respon tumor terhadap radiasi pada karsinoma nasofaring. Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya 2001: 18-36.
9. Pandiangan D., Nainggolan N. (2006). Peningkatan Kandungan Katarantin pada Kultur Kalus *Catharanthus roseus* dengan Pemberian Naphtalene Acetic Acid. *Hayati*, Vol. 13, No. 3: 90-94.
10. Kerr J. F. R., Wyllie A. H., Currie A. R. (1972). *Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon With Wide Ranging Implications in Tissue Kinetics. Pathology Department. University of Aberdeen.Br. J. Cancer Volume* 26: 239.
11. Lodish Harvey., Berk Arnold., Matsudaira Paul., Kaiser Chris A., Krieger Monty., Scott Matthew P., Zipursky Lawrence., Darnell James. (2004). *Molecular Cell Biology. 5th edition.* 924.

