

Aktivitas Antioksidan dan Sitotoksik Terhadap Sel Kanker HeLa dari Ekstrak Daun *Vernonia amygdalina* (Asteraceae)

Shabarni Gaffar^{1*}, Muhammad Yuda Nugraha¹, Ersanda Hafiz¹, Hesti Lina Wiraswati², Tati Herlina¹

¹Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, Jl. Raya Bandung-Sumedang km 21, Jatinangor, Sumedang, Jawa Barat, Indonesia

²Departemen Ilmu Kedokteran Dasar, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran, Jl. Raya Bandung-Sumedang km. 21, Jatinangor, Sumedang, Jawa Barat, Indonesia.

*Penulis korespondensi: shabarni.gaffar@unpad.ac.id

DOI: <https://doi.org/10.24198/cna.v10.n1.36779>

Abstrak: *Vernonia amygdalina* atau dikenal sebagai daun afrika merupakan salah satu tanaman obat yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai *nutraceutical*, seperti antidiabetes, antimalaria dan antikanker. Penelitian ini bertujuan menentukan aktivitas antioksidan dan aktivitas sitotoksik ekstrak daun *V. amygdalina* terhadap sel kanker serviks HeLa, serta menentukan kelompok senyawa yang terdapat dalam ekstrak daun *V. amygdalina* dengan aktivitas sitotoksik dan antioksidan tertinggi melalui penapisan fitokimia. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstraksi dan fraksinasi menggunakan pelarut metanol, etil asetat, dan *n*-heksana. Semua fraksi diuji aktivitas antioksidannya menggunakan metoda DPPH dan aktivitas sitotoksiknya terhadap sel kanker serviks HeLa menggunakan metode MTS, serta penapisan fitokimia untuk menentukan kelompok senyawa alkaloid, terpenoid, steroid, dan flavonoid. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi, IC₅₀ ekstrak metanol, etil asetat dan *n*-heksana berturut-turut adalah: 25,27; 17,89; 213,4 ppm. Hasil uji aktivitas sitotoksik menunjukkan bahwa ekstrak metanol, etil asetat dan *n*-heksana daun *V. amygdalina* bersifat kurang aktif terhadap sel kanker serviks HeLa dengan IC₅₀ berturut-turut: 519,42; 249,18 dan 367,24 ppm. Ekstrak etil asetat yang mengandung aktivitas antioksidan tertinggi mengandung kelompok senyawa flavonoid, alkaloid, steroid, dan terpenoid, sehingga berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai agen kemopreventif berdasarkan aktivitas antioksidannya.

Kata kunci: *Vernonia amygdalina*, antioksidan, aktivitas sitotoksik, fitokimia

Abstract: *Vernonia amygdalina* or known as african leaf is one of the medicinal plants that has the potential to be developed as a *nutraceutical*, such as antidiabetic, antimalarial and anticancer. This study aimed to determine the antioxidant activity and cytotoxic activity of *V. amygdalina* leaf extract against HeLa cervical cancer cells, and to determine the group of compounds contained in *V. amygdalina* leaf extract with the highest cytotoxic and antioxidant activity through phytochemical screening. The method used in this research is extraction and fractionation using methanol, ethyl acetate, and *n*-hexane as solvents. All fractions were tested for their antioxidant activity using the DPPH method and their cytotoxic activity against HeLa cervical cancer cells using the MTS method, as well as phytochemical screening to determine groups of alkaloids, terpenoids, steroids, and flavonoids. The results showed that the ethyl acetate extract had the highest antioxidant activity, IC₅₀ of methanol, ethyl acetate and *n*-hexane extracts were: 25.27; 17.89; 213.4 ppm, respectively. The results of the cytotoxic activity test showed that the methanol, ethyl acetate and *n*-hexane extracts of *V. amygdalina* leaves were less active against HeLa cervical cancer cells with IC₅₀ of 519.42; 249.18 and 367.24 ppm, respectively. Ethyl acetate extract which contains the highest antioxidant activity contains a group of flavonoid compounds, alkaloids, steroids, and terpenoids, so it has the potential to be utilized as chemopreventive agent based on its antioxidant activity.

Keywords: *Vernonia amygdalina*, antioxidant, cytotoxic activity, phytochemistry

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara yang memiliki keanekaragaman hayati yang luas sehingga menempati posisi ke-3 sebagai negara megabiodiversitas di dunia setelah Brazil dan Zaire

(RD Congo). Di seluruh hutan di wilayah Indonesia, terdapat kurang lebih 38.000 jenis tumbuhan, 6000-nya merupakan tanaman obat (Nugroho dkk. 2015; Sari & Kusharyoto 2017). Pemanfaatan tumbuhan sebagai obat herbal telah dilakukan sejak jaman dulu

oleh masyarakat Indonesia (Handayani 2015). Penelitian telah membuktikan bahwa senyawa bahan alam berpotensi untuk menghasilkan beberapa obat baru baik digunakan sebagai lead compound maupun obat herbal. Penggunaan tanaman obat Indonesia yang terbatas mendorong peneliti untuk terus mempelajari aktivitas biologisnya secara spesifik.

Salah satu jenis tanaman yang banyak digunakan sebagai tanaman obat adalah genus *Vernonia*. *Vernonia* (Asteraceae) merupakan genus terbesar dalam keluarga *Vernoniae* yang memiliki sekitar 1000 spesies. Genus ini dapat ditemukan di berbagai tempat di belahan dunia, terutama di kawasan tropis. Genus *Vernonia* diketahui memiliki habitat dengan kondisi lingkungan yang bervariasi seperti di hutan tropis, rawa-rawa, dan area yang basah, dataran kering, sabana, gurun, dan bahkan dapat tumbuh di daerah yang sangat dingin seperti di daerah timur Amerika Utara. Anggota genus *Vernonia* diketahui banyak digunakan dalam bidang pangan, medis, dan industri (Toyang & Verpoorte 2013; Audu *et al.* 2012).

Beberapa spesies dari genus *Vernonia* sering digunakan sebagai tanaman obat, diantaranya adalah *V. amygdalina*, *V. condensata*, *V. cineria*, *V. guineensis*, dan *V. conferta*. *V. condensata* diketahui merupakan anggota genus *Vernonia* yang sering digunakan untuk mengobati diare, batuk, dan pneumonia. *V. cineria* digunakan untuk mengobati malaria dan demam. *V. guineensis* digunakan untuk mengobati infeksi parasit dan malaria, serta masih banyak lagi anggota genus *Vernonia* yang memiliki aktivitas biologis yang dimanfaatkan dalam bidang medis (Toyang & Verpoorte 2013).

V. amygdalina atau umumnya dikenal sebagai daun afrika merupakan salah satu spesies dari genus *Vernonia* yang paling banyak dipelajari. Tumbuhan ini termasuk ke dalam jenis belukar yang memiliki tinggi mencapai 3 meter yang tumbuh di kawasan tropis Afrika dan negara-negara lain di Afrika seperti Nigeria, Cameroon, dan Zimbabwe (Farombi & Owoye 2011). Namun di beberapa negara tumbuhan ini memiliki nama yang berbeda seperti Etidod atau Ewuro di Nigeria, daun Afrika di Indonesia dan Kenya, dan pohon Selatan di Cina (Wong *et al.* 2013). Secara etnobotani tumbuhan ini memiliki manfaat untuk mengobati beberapa penyakit seperti hipertensi, cacingan, malaria (Bihonegn *et al.* 2019), diabetes (Atangwho *et al.* 2013, dan inflamasi (Nuryanto *et al.* 2017). Setelah dilakukan penelitian lebih lanjut, terungkap bahwa secara etnofarmakologi daun tumbuhan ini memiliki aktivitas sebagai, antivirus, dan antikanker (Oyeyemi *et al.* 2017).

Berdasarkan studi daun *V. amygdalina* juga diketahui memiliki aktivitas antioksidan yang cukup potensial untuk dijadikan sebagai agen kemopreventif untuk mencegah terbentuknya karsinogen akibat ROS (*reactive oxygen species*) (Rohin *et al.* 2014). Atangwho *et al.* (2013) melaporkan aktivitas antioksidan ekstrak daun *V. amygdalina* yang cukup

baik dengan nilai IC₅₀ 21,72 µg/mL. Owolabi *et al.* (2008) melaporkan aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun *V. amygdalina* terhadap DPPH memiliki nilai IC₅₀ 10,09 µg/mL. Selain itu Omoregie & Pal (2016) juga melaporkan aktivitas ekstrak daun *V. amygdalina* terhadap peroksidasi lipid dimana hasilnya menunjukkan adanya penurunan tingkat peroksidasi lipid setelah paparan ekstrak daun *V. amygdalina*.

Kanker merupakan kelompok penyakit yang disebabkan oleh pertumbuhan sel yang tidak terkontrol serta invasi dan penyebaran sel dari situs awal ke situs lain di dalam tubuh (Pecorino 2012). Kanker merupakan salah satu penyakit penyebab kematian ke-2 terbanyak di dunia. Pada tahun 2018 terjadi sekitar 9,6 juta kasus kematian yang disebabkan oleh kanker (WHO 2019). Kasus kanker serviks di Indonesia setiap tahunnya menempati posisi kedua tertinggi didunia, dan 50%-nya berakhir dengan kematian (Kementrian Kesehatan 2019). Sel HeLa merupakan sel kanker serviks yang terinfeksi virus HPV-18 yang banyak digunakan untuk penelitian. Sel ini sudah diketahui mengandung gen p53 tipe liar namun ekspresinya rendah (Landry *et al.* 2013).

Beberapa penelitian telah melaporkan aktivitas sitotoksik ekstrak daun *V. amygdalina* terhadap sel kanker. Salah satunya adalah penelitian yang dilakukan oleh Ngbolua *et al.* (2011) yang menunjukkan adanya aktivitas sitotoksik ekstrak etanol daun *V. amygdalina* terhadap sel leukemia P-388 dengan IC₅₀ 30,82 µg/mL. Selain itu Johnson *et al.* (2017) melaporkan aktivitas sitotoksik ekstrak metanol daun *V. amygdalina* terhadap sel kanker prostat dengan IC₅₀ 196,6 µg/mL.

Genus *Vernonia* mengandung beberapa kelompok metabolit sekunder seperti steroid, terpenoid, alkaloid, flavonoid, turunan asam lemak dan poliketida (Alara *et al.* 2017a; Thirumurugan *et al.* 2018). Berdasarkan studi pustaka, belum terdapat penelitian yang melaporkan aktivitas antioksidan dan sitotoksik daun *V. amygdalina* yang tumbuh di Indonesia terhadap sel kanker serviks HeLa. Oleh karena itu, penelitian ini bermaksud untuk mengungkapkan aktivitas antioksidan dan aktivitas sitotoksik *V. amygdalina* terhadap sel kanker serviks HeLa, serta kandungan fitokimia dalam ekstrak daun *V. amygdalina* sehingga dapat dijadikan sebagai agen kemopreventif dan terapi kanker.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Daun *V. amygdalina* diperoleh dari kecamatan Buah Batu, kota Bandung, provinsi Jawa Barat. Sel HeLa yang digunakan adalah koleksi kultur sel dari Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran. Medium Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640), fetal bovine serum (FBS), larutan 0.25% Trypsin-EDTA, Penicillin-Streptomycin (PSM) 5000 U/mL, DMSO (Dimetil sulfoksida;

(CH₃)₂SO), kloroform, isopropil alkohol, etanol 75%, dan *DEPC-treated water* dibeli dari Sigma Aldrich. MTS assay kit (CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay dari Promega. Pelarut organik metanol, etil asetat, dan *n*-heksana teknis yang di re-distilasi. Aseton, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), PBS, asam askorbat, asam klorida, serbuk Mg, kloroform amoniakal, asam sulfat, pereaksi Hager, Mayer, Wagner, Dragendorf, dan Liebermann-Burchard diperoleh dari Sigma Aldrich.

Alat

Peralatan destilasi, ekstraksi, *rotary evaporator* Buchi tipe R 144, tabung vial, neraca analitik, inkubator CO₂ (NuAire, Plymouth, MN, USA). 96-well plate reader Nano Quant (TECAN), alat gelas, pipet mikro, tip pipet 10-200 µL, 100-1000 µL, dan 2-10 µL, spektrofotometer UV-Vis, kuvet, plat tetes, dan spatula.

Ekstraksi Daun Afrika (*V. amygdalina*)

Daun *V. amygdalina* yang telah dikeringkan di udara terbuka dipotong kecil-kecil, kemudian dimaserasi dengan metanol selama 3 × 24 jam pada suhu kamar. Filtrat disaring dan di evaporasi pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak pekat metanol. Ekstrak kemudian dipartisi berturut-turut kedalam *n*-heksana dan etil asetat. Masing-masing ekstrak diuapkan pada tekanan rendah, suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak pekat *n*-heksana dan etil asetat.

Uji Aktivitas Antioksidan

Penentuan aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan radikal bebas, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Brand-William *et al.* 1995). Sebanyak 5 mg ekstrak metanol, *n*-heksana, dan etil asetat ditimbang dan dilarutkan dalam 10 mL metanol kemudian dihomogenkan dan dijadikan sebagai larutan stok. Larutan stok kemudian diencerkan dengan variasi konsentrasi (10; 20; 30; 40; 50; 60; 100; 120 ppm). Masing-masing sebanyak 5 mL ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan DPPH (30 ppm) dengan volume yang sama dan dihomogenkan, selanjutnya diinkubasi selama 30 menit pada ruangan gelap dan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Metanol digunakan sebagai blanko dan DPPH (30 ppm) sebagai kontrol. Absorbansi yang diperoleh dikonversi untuk menghitung % inhibisi DPPH setelah ditambahkan ekstrak menggunakan persamaan (1).

$$\text{Persen inhibisi} = \frac{A_k - A_s}{A_k} \times 100\% \quad \dots (1)$$

dengan

A_k = Absorbansi kontrol

A_s = Absorbansi sampel

Plot % inhibisi vs Ln konsentrasi dibuat untuk menghasilkan persamaan regresi linear yang digunakan untuk menentukan nilai IC₅₀.

Peremajaan Kultur Sel HeLa

Kultur sel HeLa dikeluarkan dari inkubator (-80°C) dan dicairkan, kemudian dicuci menggunakan 5 mL PBS sebanyak tiga kali. Setelah itu ditambahkan 1 mL tripsin-EDTA dan diinkubasi selama 5 menit dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C untuk melepas sel HeLa dari dasar cawan. Sel kemudian disuspensi dengan campuran larutan 5 mL 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*) dan 45 mL RPMI. Campuran tersebut dipindahkan ke tabung sentrifugasi 50 mL dan disentrifugasi selama 5 menit. Supernatan dibuang, kedalaman endapan ditambahkan 2 mL RPMI-FBS-PSM dan diresuspensi secara perlahan hingga pellet sel larut.

Untuk menghitung jumlah sel hidup, sebanyak 20 µL suspensi sel dipindahkan kedalam tabung dan ditambahkan 20 µL tripan blue, kemudian diresuspensi dan jumlah sel hidup dihitung dibawah haemasitometer. Sementara itu, suspensi sel dalam tabung reaksi kemudian dipindahkan ke tabung sentrifugasi baru dan ditambahkan 2 mL RPMI-FBS-PSM lalu diresuspensi. Sebanyak 50 µL suspensi tersebut kemudian dipindahkan ke setiap sumur pada 96-well plate kecuali pada sumur blanko diisi 50 µL media RPMI. Selanjutnya sel dalam setiap sumur diamati dibawah mikroskop inverted.

Penentuan Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Daun *V. amygdalina*

Sel yang telah ditanam dalam 96-well plate dengan kepadatan 17.000 sel/well diinkubasi dan diamati dengan mikroskop inverted hingga sel mencapai konfluen 80%. Jika sudah konfluen, media kultur dibuang dan diganti dengan 50 µL media kultur baru. Ekstrak daun *V. amygdalina* (5 mg) dilarutkan dalam 1 mL DMSO 2,5% kemudian dilakukan pengenceran bertingkat. Sebanyak 50 µL sampel dengan variasi konsentrasi pengenceran 0,5× (9,8; 19,53; 39,07; 78,125; 156,25; 312,5; 625; 1250 µg/mL), kontrol positif *doxorubicin* (0,75; 1,5; 3; 6; 12; 24; 48; 96 µg/mL) dan kontrol negatif (pelarut) dimasukkan ke dalam 96-well plate dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan 5% gas CO₂. Supernatan dibuang menggunakan mikropipet steril, kemudian ditambahkan 20 µL reagen MTS dan diinkubasi dalam ruangan gelap selama 4 jam pada suhu 37°C dan 5% gas CO₂. Setelah itu 25 µL SDS 10% ditambahkan ke dalam setiap sumur untuk melarutkan kristal formazan yang terbentuk dan kemudian absorbansi diukur menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 490 nm. Absorbansi terkoreksi diperoleh dari hasil pengurangan absorbansi sampel terhadap absorbansi *background*. Nilai tersebut kemudian dikonversi ke persentase sel hidup yang dihitung dengan persamaan (2).

$$\% \text{sel hidup} = \frac{As - Am}{Ak - Am} \times 100\% \quad \dots (2)$$

dengan

As = Absorbansi sampel
Am = Absorbansi media
Ak = Absorbansi kontrol sel

Penapisan Fitokimia

Alkaloid

Sebanyak 0,1 gram ekstrak ditambahkan 10 mL kloroform dan beberapa tetes amonia. Fraksi kloroform dipisahkan dan diasamkan dengan beberapa tetes H₂SO₄ pekat. Fraksi asam diambil dan dibagi menjadi tiga tabung, ditambahkan pereaksi Dragendorf, Mayer, dan Wagner. Keberadaan alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih pada pereaksi Meyer, endapan merah pada pereaksi Dragendorf, dan endapan coklat pada pereaksi Wagner

Steroid/triterpenoid

Sebanyak 1 g ekstrak dilarutkan dengan 25 mL etanol, kemudian disaring menggunakan cawan porselen dan diuapkan sampai kering. Residu dilarutkan dengan eter dan dipindahkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 3 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes H₂SO₄ pekat (Uji Lieberman Burchard). Warna merah atau ungu menunjukkan triterpenoid dan warna hijau atau biru menunjukkan steroid (Burke *et al.* 1974).

Flavonoid

Ekstrak ditambahkan serbuk magnesium 0,1 mg dan 0,4 mL amil alkohol (campuran asam klorida 37% dan etanol 95% dengan volume yang sama) dan 4 mL alkohol kemudian campuran dikocok. Pembentukan warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan hasil flavonoid.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Preparasi dan Ekstraksi Daun *V. amygdalina*

Sebanyak 4,5 kg daun *V. amygdalina* kering yang diperoleh dari Buah Batu, Bandung digunakan pada penelitian ini. Pengeringan dilakukan di udara terbuka dan tidak terpapar sinar matahari. Daun kering dihaluskan hingga menjadi serbuk untuk memperbesar luas permukaan daun. Serbuk daun *V. amygdalina* dimaserasi menggunakan pelarut metanol pada suhu ruang. Proses maserasi dilakukan berkali-kali hingga ekstrak yang dihasilkan tidak berwarna. Ekstrak metanol dipekatkan menggunakan rotary evaporator untuk memisahkan ekstrak dari pelarutnya sehingga menghasilkan ekstrak pekat metanol (250,7 g). Sebanyak 10 g ekstrak metanol disimpan untuk diuji dan sisanya dipartisi secara bertingkat menggunakan pelarut *n*-heksana dan etil asetat. Ekstrak hasil partisi dipekatkan dengan rotary evaporator dalam keadaan vakum dan diperoleh

massa ekstrak pekat *n*-heksana (22,2 g) dan etil asetat (12,43 g).

Penentuan Aktivitas Antioksidan

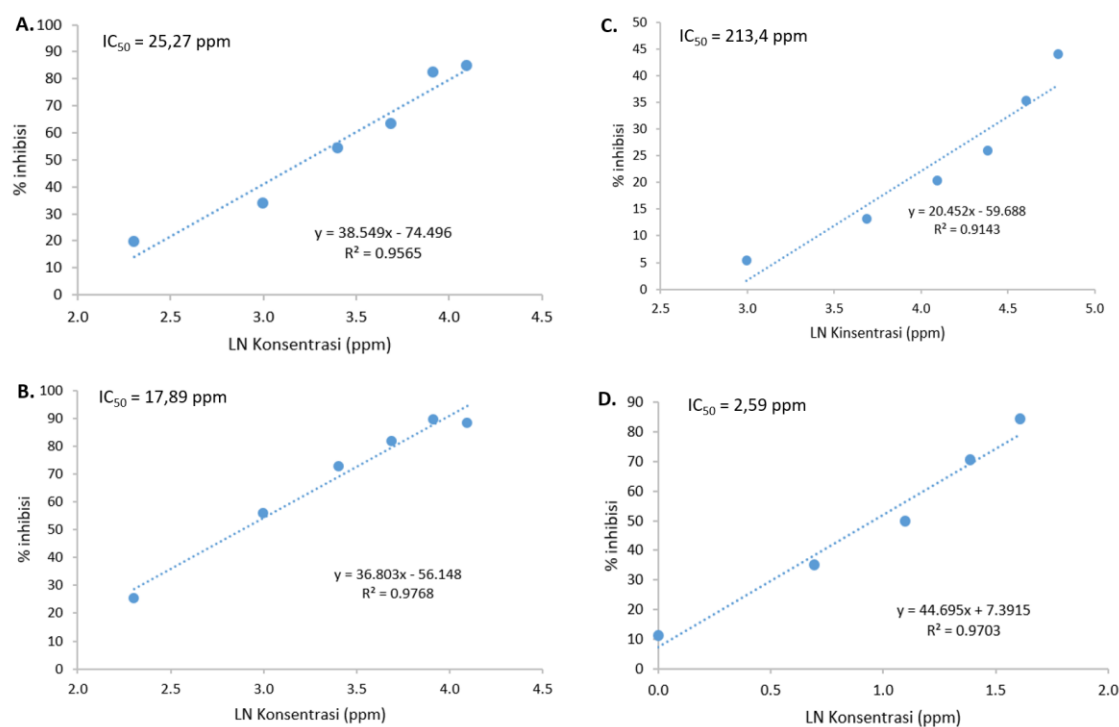
Masing-masing ekstrak yang telah dipekatkan diuji aktivitas antioksidannya menggunakan radikal 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) yang berwarna violet sebagai pro-oksidan, sebagai kontrol positif digunakan asam askorbat. Uji 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) adalah uji antioksidan yang paling umum digunakan untuk ekstrak tumbuhan. Pada pengujian ini, molekul atau antioksidan dengan ikatan A-H yang lemah akan bereaksi dengan radikal bebas DPPH• yang stabil yang menyebabkan perubahan warna, absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum DPPH yaitu 517 nm (Kadare & Singh 2011).

Ekstrak pekat metanol, etil asetat dan *n*-heksana dilarutkan dengan metanol dan diencerkan sesuai variasi konsentrasi. Atangwho *et al.* (2013) melaporkan IC₅₀ ekstrak metanol daun *V. amygdalina* adalah 21,72 µg/mL, namun ekstrak *n*-heksana memiliki aktivitas antioksidan lebih rendah, sehingga digunakan rentang konsentrasi dari 10-120 ppm. Persen inhibisi DPPH setelah paparan ekstrak diperlihatkan pada Gambar 1.

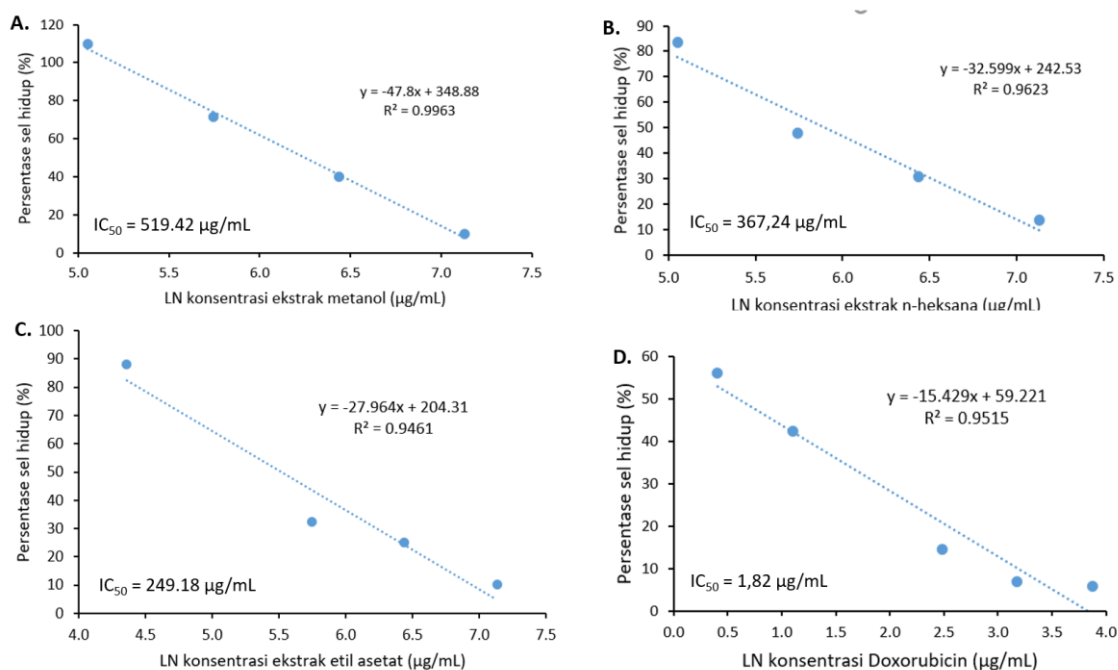
Nilai IC₅₀ aktivitas antioksidan ekstrak metanol, etil asetat dan *n*-heksana daun *V. amygdalina* berturut-turut adalah: 25,27 ppm, 17,89 ppm dan 213,4 ppm. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat dan metanol memiliki aktivitas antioksidan yang cukup tinggi dan termasuk kategori aktif (rentang 10-100 µg/mL) (Jabit *et al.* 2009). Berdasarkan hal tersebut, diduga ekstrak metanol dan etil asetat daun *V. amygdalina* mengandung senyawa-senyawa bioaktif yang dapat mendonorkan elektron atau hidrogen dengan kuat sehingga memiliki aktivitas antioksidan yang cukup tinggi. Sementara itu ekstrak *n*-heksana termasuk kurang aktif karena IC₅₀-nya di atas 100 µg/mL. Sebagai kontrol positif, asam askorbat juga diuji aktivitas antioksidannya terhadap DPPH dengan nilai IC₅₀ 2,59 ppm.

Aktivitas antioksidan ekstrak daun *V. amygdalina* bergantung pada polaritas pelarut ekstraksi serta konsentrasi ekstrak yang ditambahkan ke dalam sistem yang mengandung radikal bebas. Ekstrak *n*-heksana memiliki aktivitas antioksidan yang rendah menunjukkan bahwa senyawa-senyawa yang larut dalam pelarut nonpolar mengandung sedikit senyawa yang dapat mendonorkan proton (Atangwho *et al.* 2013).

Aktivitas antioksidan dipengaruhi oleh kandungan total senyawa fenolik dan flavonoid dalam ekstrak. Semakin tinggi kandungan fenolik maka semakin tinggi pula aktivitas antioksidannya (Alara *et al.* 2017b). Ekstrak *V. amygdalina* mengandung antioksidan alami, berpotensi sebagai antioksidan terhadap radikal yang larut dalam air dan spesies ion reaktif. Ekstrak air dan etil asetat daun *V. amygdalina* dilaporkan dapat menghambat kerusakan DNA secara



Gambar 1. Persen inhibisi DPPH setelah perlakuan dengan: A. ekstrak metanol, B. ekstrak etil asetat, C. ekstrak *n*-heksana, D. asam askorbat.



Gambar 2. Kurva aktivitas sitotoksik ekstrak daun *V. amygdalina* terhadap sel HeLa setelah inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C gas CO₂ 5% dan serapan diukur pada λ 490 nm A. Ekstrak metanol, B. Ekstrak *n*-heksana, C. Ekstrak etil asetat D. Kontrol positif Doxorubicin.

in vitro (Bello *et al.* 2018). Ekstrak daun *V. amygdalina* juga dapat menghambat pemutihan β -karoten, oksidasi asam linoleat dan peroksidasi lipid yang diinduksi oleh Fe²⁺/askorbat dalam preparasi mikrosomal hati tikus (Owolabi *et al.* 2008).

Aktivitas Sitotoksik ekstrak daun *V. amygdalina* terhadap sel HeLa

Uji aktivitas sitotoksik dilakukan terhadap tujuh kelompok sampel, yaitu: kontrol positif doxorubicin, ekstrak metanol, ekstrak etil asetat, ekstrak *n*-

heksana, kontrol pelarut, kontrol sel, dan kontrol media. Pada uji ini digunakan senyawa tetrazolium [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; MTS] dan reagen kopling elektron (phenazine ethosulfate; PES) untuk meningkatkan stabilitas kimia, sehingga dapat membentuk larutan yang stabil dengan MTS. Senyawa tetrazolium MTS (pereaksi Owen) akan mengalami bioreduksi oleh sel menjadi produk formazan berwarna ungu yang larut dalam media kultur. Konversi ini mungkin dilakukan oleh NADPH atau NADH yang dihasilkan oleh enzim dehidrogenase dalam sel yang aktif secara metabolik (Berridge & Tan 1993). Pengujian dilakukan dengan menambahkan sejumlah kecil reagen MTS ke sumur kultur, diinkubasi selama 1-4 jam dan kemudian diukur absorbansinya pada 490 nm dengan pembaca pelat 96-sumur (Corry 1991; Riss & Moravec 1992). Hasil pengujian aktivitas sitotoksik ekstrak metanol, etil asetat dan *n*-heksana dan doxorubicin diperlihatkan pada Gambar 2.

Suatu senyawa bersifat sitotoksik sangat aktif bila IC_{50} -nya lebih kecil dari 20 $\mu\text{g/mL}$, IC_{50} 20-200 $\mu\text{g/mL}$ bersifat aktif, dan IC_{50} 200-500 $\mu\text{g/mL}$ bersifat kurang aktif, serta IC_{50} diatas 500 $\mu\text{g/mL}$ bersifat tidak aktif. Berdasarkan pengujian terlihat bahwa kontrol positif, obat antikanker doxorubicin yang sudah umum digunakan bersifat sangat aktif dengan IC_{50} 1,82 $\mu\text{g/mL}$ (Sajjadi *et al.* 2015). IC_{50} ekstrak metanol, etil asetat dan *n*-hexana terhadap sel HeLa berturut-turut adalah 519,42; 249,18 dan 367,24 $\mu\text{g/mL}$, sehingga ekstrak metanol tergolong tidak aktif, sementara ekstrak *n*-heksana dan etil asetat bersifat kurang aktif terhadap sel kanker serviks HeLa. Tabel 1 memperlihatkan perbandingan hasil penelitian ini dengan hasil yang diperoleh oleh Lifiani *et al.* (2018), Bestari *et al.* (2018) dan Fachrunnisa *et al.* (2019).

Berdasarkan Tabel 1 dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun *V. amygdalina* tidak terlalu aktif terhadap sel kanker serviks HeLa. Hal ini disebabkan karena adanya perbedaan fenotipe dan genotype dari sel kanker yang digunakan. Sejumlah protein dan gen terlibat pada mekanisme karsinogenesis, setiap sel kanker memiliki fenotipe yang khas akibat adanya mutasi pada DNA pada gen-gen karsinogenesis yang

berbeda. Mutasi ini akan menyebabkan perubahan konformasi pada protein tertentu sehingga protein tersebut tidak dapat menjalankan fungsinya dengan baik.

Jisaka *et al.* (1993) telah berhasil mengisolasi beberapa senyawa golongan sesquiterpen laktone dari ekstrak etil asetat yang memiliki aktivitas sitotoksik sangat tinggi. Tiga dari senyawa tersebut adalah vernodalin, vernolida, dan hidroksivernolida. Ketiga senyawa tersebut diuji terhadap sel leukemia P-388 memiliki IC_{50} masing-masing 0,11; 0,13; dan 0,92 $\mu\text{g/mL}$. Efek sitotoksik ketiga senyawa juga diuji terhadap sel leukemia L-1210 dengan IC_{50} masing-masing: 0,17; 0,11; dan 1,25 $\mu\text{g/mL}$. Tingginya aktivitas sitotoksik ketiga senyawa tersebut diduga disebabkan karena adanya gugus α -metilen- γ -laktone. Disamping itu, aktivitas hidroksivernolida terlihat lebih rendah dibandingkan dua senyawa lainnya yang diduga karena hilangnya hidrofobisitas pada gugus asil.

Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan dengan menguji keberadaan kelompok senyawa alkaloid, flavonoid, steroid, dan terpenoid dalam ekstrak etil asetat daun *V. amygdalina* dengan menggunakan pereaksi yang sesuai. Hasilnya menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat mengandung semua kelompok senyawa yang diuji karena menunjukkan hasil yang positif pada semua uji seperti terlihat pada Tabel 2. Hasil ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Offor (2014) yaitu flavonoid merupakan kelompok senyawa yang paling banyak ditemukan di dalam ekstrak daun *V. amygdalina*.

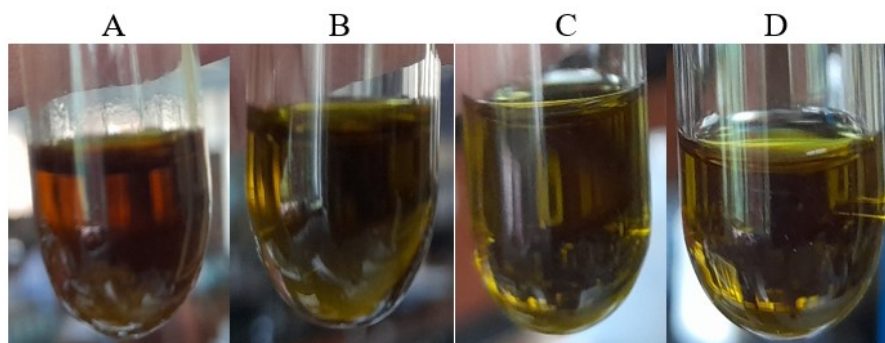
Pada uji alkaloid dengan pereaksi dragendorff menunjukkan hasil positif terlihat dari terbentuknya endapan (Gambar 3A). Gugus yang mengandung atom nitrogen pada senyawa alkaloid akan membentuk ikatan kovalen koordinasi dengan ion K^+ dari kalium tetraiodobismut sehingga menghasilkan suatu kompleks kalium-alkaloid yang mengendap (Habibi dkk. 2018). Sementara itu, penapisan kelompok senyawa alkaloid dengan pereaksi Hager, Wagner, dan Mayer menunjukkan hasil yang negatif dengan tidak terbentuknya endapan.

Tabel 1. IC_{50} ekstrak daun *V. amygdalina* sel kanker payudara T47D, sel kanker kolon WiDr, dan sel kanker payudara MCF-7 dan sel kanker serviks HeLa

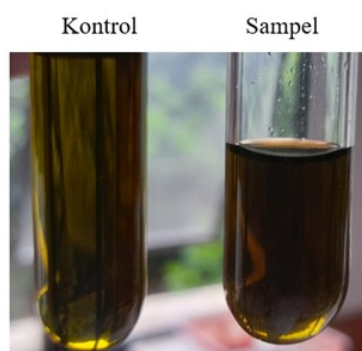
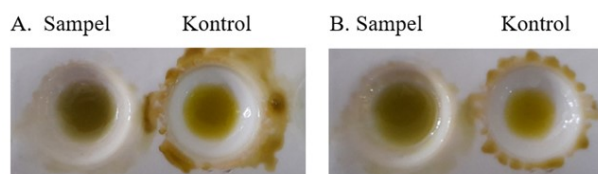
Jenis Ekstrak	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			
	Lifiani <i>et al.</i> (2018) Sel T47D	Bestari <i>et al.</i> (2018) Sel WiDr	Fachrunisa <i>et al.</i> (2019) Sel MCF7	Penelitian ini Sel HeLa
etil asetat	55,50	9,086	50,365	249,18
<i>n</i> -heksana	164,85	9.934,963	206,211	367,24
Etanol/metanol	311,72	321,131	967,033	519,42

Tabel 2. Hasil penapisan fitokimia ekstrak etil asetat daun *V. amygdalina*

Flavonoid	Alkaloid				Terpenoid	Steroid
	Hager	Mayer	Wagner	Dragendorf		
+	-	-	-	+	+	+

**Gambar 3.** Penapisan fitokimia kelompok senyawa alkaloid, A) uji Dragendorf, B) uji Hager, C) uji Mayer, dan D) uji Wagner.

Pada uji flavonoid menunjukkan hasil positif dengan berubahnya warna menjadi kemerahan (Gambar 4). Penambahan asam klorida pekat pada uji flavonoid berguna untuk menghidrolisis flavonoid menjadi aglikonnya, yaitu dengan menghidrolisis *O*-glikosil. Glikosil akan tergantikan oleh H^+ dari asam karena sifatnya yang elektrofilik. Senyawa yang terhidrolisis tersebut kemudian direduksi oleh magnesium sehingga menghasilkan senyawa kompleks yang berwarna merah (Thirumurugan et al., 2018).

**Gambar 4.** Penapisan fitokimia kelompok senyawa flavonoid**Gambar 5.** Penapisan fitokimia kelompok senyawa A) terpenoid dan B) steroid.

Sementara itu pada uji triterpenoid dan steroid menunjukkan hasil positif pada keduanya (Gambar 5). Pengujian dilakukan sebanyak dua kali, pada uji pertama hasil menunjukkan positif untuk triterpenoid dengan terbentuknya larutan berwarna hijau kebiruan, kemudian setelah didiamkan beberapa saat hasil menunjukkan positif untuk steroid dengan terbentuknya larutan berwarna merah. Hal ini mungkin saja dapat terjadi karena dalam ekstrak etil asetat terkandung senyawa terpenoid dan steroid, hanya saja jumlah dari kedua senyawa tersebut berbeda.

KESIMPULAN

Ekstrak etil asetat daun *V. amygdalina* memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi dengan IC_{50} ekstrak metanol, etil asetat dan *n*-heksana berturut-turut sebesar: 25,27; 17,89; 213,4 ppm. IC_{50} aktivitas sitotoksik ekstrak metanol, etil asetat dan *n*-heksana daun *V. amygdalina* terhadap sel kanker serviks HeLa berturut-turut: 519,42; 249,18 dan 367,24 ppm sehingga bersifat kurang aktif. Ekstrak etil asetat yang mengandung aktivitas antioksidan tertinggi mengandung kelompok senyawa flavonoid, alkaloid, steroid, dan terpenoid, sehingga berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai agen kemopreventif berdasarkan aktivitas antioksidannya.

DAFTAR PUSTAKA

Alara, O.R., Abdurahman, N.H., Mudalip, S.K.A. & Olalere, O.A. (2017a). Phytochemical and pharmacological properties of *Vernonia amygdalina*: A Review. *Journal of Chemical Engineering and Industrial Biotechnology*. 2: 80–96.

- Alara, O.R., Abdurahman, N.H., Mudalip, S.K.A. & Olalere, O.A. (2017b). Characterization and effect of extraction solvents on the yield and total phenolic content from *Vernonia amygdalina* leaves. *Journal of Food Measurement and Characterization*. **12**(1): 311–316.
- Atangwho, I.J., Egbung, G.E., Ahmad, M., Yam, M.F. & Asmawi, M.Z. (2013). Antioxidant versus anti-diabetic properties of leaves from *Vernonia amygdalina* Del. growing in Malaysia. *Food Chemistry*. **141**(4): 3428–3434.
- Audu, S.A., Taiwo, A.E., Ojuolape, A.R., Sani, A.S., Bukola, A.R. & Mohammed, I. (2012). A study review of documented phytochemistry of *Vernonia amygdalina* (family asteraceae) as the basis for pharmacologic activity of plant extract. *Journal of Natural Sciences Research*. **2**(7): 1–8.
- Bello, S.S., Evalde, N., Samuel, C., Okai, I.R., Kelechi, E.C. & Chinyere, I.C. (2018). *In vitro* DNA damage inhibition activity of aqueous and ethyl acetate extract of *Vernonia amygdalina* leaves. *World Journal of Pharmaceutical Research*. **7**(19): 256–266.
- Berridge, M.V. & Tan, A.S. (1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives in Biochemistry and Biophysics*. **303**: 474–482.
- Bestari, R., Ichwan, M.F., Mustofa, M. & Satria, D. (2018). Anticancer activity of *Vernonia amygdalina* del. extract on WiDr colon cancer cell line. *Advances in Helath Sciences Research*. **9**(2): 172–176.
- Bihonegn, T., Giday, M., Yimer, G., Animut, A. & Sisay, M. (2019). Antimalarial activity of hydro methanolic extract and its solvent fractions of *Vernonia amygdalina* leaves in mice infected with *Plasmodium berghei*. *SAGE Open Medicine*. **7**: 205031211984976.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*. **28**(1): 25–30.
- Burke, R.W., Diamondstone, B.I., Velapoldi, R.A. & Menis, O. (1974). Mechanisms of the Liebermann Burchard and Zak color reactions for cholesterol. *Clinical Chemistry*. **20**(7): 794–801.
- Cory, A.H., Owen, T.C., Barltrop, J.A. & Cory, J.G. (1991). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Communications*. **3**(7): 207–212.
- Fachrunisa, D., Hasibuan, P.A.Z. & Harahap, U. (2019). Cell cycle inhibition and apoptotic induction of *Vernonia amygdalina* del. leaves extract on MCF-7 cell line. *Macedonian Journal of Medical Sciences*. **7**(22): 3807–3810.
- Farombi, E.O. & Owoeeye, O. (2011). Antioxidative and chemopreventive properties of *Vernonia amygdalina* and *Garcinia biflavonoid*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. **8**(6): 2533–2555.
- Habibi, A.I., Firmansyah, R.A., & Setyawati, S.M. (2018). Skrining fitokimia ekstrak *n*-heksan korteks batang salam (*Syzygium polyanthum*). *Indonesian Journal of Chemical Science*. **7**(1): 1–4.
- Handayani, A. (2015). Pemanfaatan tumbuhan berkhasiat obat oleh masyarakat sekitar cagar alam Gunung Simpang, Jawa Barat. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia*. **1**(6): 1425–1432.
- Jabit, M.L., Wahyuni, F.S., Khalid, R., Israf, D.A., Shaari, K., Lajis, N.H. & Stanslas, J. (2009). Cytotoxic and nitric oxide inhibitory activities of metanol extracts of garcinia species. *Pharmaceutical Biology*. **47**(11): 1019–1026.
- Jisaka, M., Ohigashi, H., Takegawa, K., Koshimizu, K. & Huffman, M.A. (1993). Antitumoral and antimicrobial activities of bitter sesquiterpene lactones of *Vernonia amygdalina*, a possible medicinal plant used by wild chimpanzees. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. **57**(5): 833–834.
- Johnson, W., Tchounwou, P.B. & Yedjou, C.G. (2017). Therapeutic mechanisms of *Vernonia amygdalina* delile in the treatment of prostate cancer. *Molecules*. **22**(10): 1–13.
- Kedare, S.B. & Singh, R.P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*. **48**(4): 412–422.
- Kementerian Kesehatan RI (2019) Hari Kanker Sedunia 2019.
- Landry, J.J.M., Pyl, P.T., Rausch, T., Zichner, T., Tekkedil, M.M., Stütz, A.M., Jauch, A., Aiyar, R.S., Pau, G., Delhomme, N., Gagneur, J., Korbel, J.O., Huber, W., & Steinmetz, L.M. (2013). The Genomic and Transcriptomic Landscape of a HeLa Cell Line. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. **3**(8): 1213–1224.
- Lifiani, R., Harahap, U., Zaitun Hasibuan, P.A. & Satria, D. (2018). Anticancer effect of african leaves (*Vernonia amygdalina* del.) to T47D cell resistant. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. **11**(1): 4–7.
- Ngbolua, K., Rakotoarimanana, H., Rafatro, H., Ratsimamanga, U., Mudogo, V., Mpiana, P. & Tshibangu, D. (2011). Comparative antimalarial and cytotoxic activities of two *Vernonia* species: *V. amygdalina* from the Democratic Republic of Congo and *V. cinerea* subsp *vialis* endemic to Madagascar. *International Journal*

- of *Biological and Chemical Sciences*. **5(1)**: 345–353.
- Nugroho, A.S., Anis, T. & Ulfah, M. (2015) Analisis keanekaragaman jenis tumbuhan berbuah di hutan lindung Surokonto, Kendal, Jawa Tengah dan potensinya sebagai kawasan konservasi burung. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia*. **1(3)**: 472–476.
- Nuryanto, M.K., Paramita, S., Iskandar, A., Ismail, S. & Ruslim, A.K. (2017) Aktivitas anti-inflamasi *in vitro* ekstrak etanol daun *Vernonia amygdalina* delile dengan pengujian stabilisasi membran. *Jurnal Sains dan Kesehatan*. **1(8)**: 402–407.
- Offor, C.E. (2014) Comparative chemical analyses of *Vernonia amygdalina* and *Azadirachta indica* leaves. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. **9(5)**: 73–77.
- Omoriegbe, E.S. & Pal, A. (2016) Antiplasmodial, antioxidant and immunomodulatory activities of ethanol extract of *Vernonia amygdalina* del. leaf in Swiss mice. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. **6(2)**: 236–247.
- Owolabi, M.A., Jaja, S.I., Oyekanmi, O.O. & Olatunji, O.J. (2008) Evaluation of the antioxidant activity and lipid peroxidation of the leaves of *Vernonia amygdalina*. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*. **5(1)**: 21.
- Oyeyemi, I.T., Akinlabi, A.A., Adewumi, A., Aleshinloye, A.O. & Oyeyemi, O.T. (2017) *Vernonia amygdalina*: A folkloric herb with anthelmintic properties. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. **7(1)**: 43–49.
- Pecorino, L. (2012) *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics*. 3rd ed. Oxford University Press. Oxford.
- Riss, T.L. & Moravec, R.A. (1992) Comparison of MTT, XTT, and a novel tetrazolium compound for MTS for *in vitro* proliferation and chemosensitivity assays. *Molecular Biology of the Cell* (Suppl.) **3**: 184a.
- Rohin, M.A.K., Hadi, N., Naim, R., Baig, A.A. & Mahmud, K. (2014) Study on antioxidant capacity and anticancer activity of bismillah leaf (*Vernonia amygdalina*). *World Journal of Pharmaceutical Research*. **3(6)**: 14–29.
- Sajjadi, S.E., Ghanadian, M., Haghighi, M. & Mouhebat, L. (2015) Cytotoxic effect of *Cousinia verbascifolia* Bunge against OVCAR-3 and HT-29 cancer cells. *Journal of HerbMed Pharmacology*. **4(1)**: 15–19.
- Sari, M. & Kusharyoto, W. (2016) Evaluasi aktivitas anti mikobakterium tanaman obat Indonesia dengan pengujian reduksi resazurin. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia*. **2(2)**: 138–142.
- Thirumurugan, D., Cholarajan, A., Raja, S.S.S. & Vijayakumar, R. (2018) An Introductory Chapter: Secondary Metabolites. In Vijayakumar, R. & Raja, S.S.S. (eds). *Secondary Metabolites: Sources and Application*. IntechOpen. London. pp. 3–22.
- Toyang, N.J. & Verpoorte, R. (2013) A review of the medicinal potentials of plants of the genus *Vernonia* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*. **146(3)**: 681–723.
- Wong, F.C., Woo, C.C., Hsu, A. & Tan, B.K.H. (2013) The anti-cancer activities of *Vernonia amygdalina* extract in human breast cancer cell lines are mediated through caspase-dependent and p53-independent pathways. *PLoS ONE*. **8(10)**: e78021.
- World Health Organization (2019) Cancer. Tersedia di: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1