

**JURNAL SKRIPSI**

**SITOTOKSISITAS EKSTRAK ETANOL DAUN TAPAK DARA (*Catharanthus roseus*  
(L.) G. Don.) TERHADAP *CELL LINE* KANKER SERVIKS (HeLa) DAN *CELL LINE*  
KANKER PAYUDARA (MCF-7)**

Disusun oleh:  
**Ayu Suraduhita**  
NPM: 130801379



**UNIVERSITAS ATMA JAYA YOGYAKARTA  
FAKULTAS TEKNOBIOLOGI  
PROGRAM STUDI BIOLOGI  
YOGYAKARTA  
2017**

**SITOTOKSISITAS EKSTRAK ETANOL DAUN TAPAK DARA (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don.) TERHADAP *CELL LINE* KANKER SERVIKS (HeLa) DAN *CELL LINE* KANKER PAYUDARA (MCF-7)**

**CYTOTOXICITY OF TAPAK DARA (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don.) LEAF ETHANOL EXTRACT ON CERVICAL (HeLa) AND BREAST (MCF-7) CANCER CELL LINES**

Ayu Suraduhita<sup>1</sup>, B. Boy Rahardjo Sidharta<sup>1</sup>, Nastiti Wijayanti<sup>2</sup>

1. Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta  
Jalan Babarsari no. 44, Yogyakarta 55281
2. Laboratorium Fisiologi Hewan, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada  
Jalan Teknik Selatan, Sekip Utara, Yogyakarta 55281  
[ayura\\_1995@yahoo.com](mailto:ayura_1995@yahoo.com)

**ABSTRAK**

Daun tapak dara mengandung lebih dari 70 jenis alkaloid, diantaranya ialah vinkristin yang bermanfaat sebagai antikanker. Pada penelitian ini hal yang diujikan ialah sitotoksitas ekstrak daun tapak dara terhadap sel kanker serviks (HeLa) dan sel kanker payudara (MCF-7) dengan variasi konsentrasi pengekstrak etanol yakni 70, 80 dan 90%. Ekstraksi yang digunakan ialah dengan metode maserasi selama 5 hari dan remaserasi pada hari ketiga. Ekstraksi yang digunakan ialah dengan metode maserasi selama 5 hari dan remaserasi pada hari ke-3. Ekstrak kemudian diuji secara kualitatif dan kuantitatif. Uji kualitatif dilakukan dengan uji fitokimia (uji alkaloid) dan uji kuantitatif dilakukan menggunakan HPLC. Ekstrak yang sudah diuji secara kualitatif dan kuantitatif kemudian diujikan pada sel HeLa dan MCF-7 untuk memperoleh nilai  $IC_{50}$  dengan metode MTT dan hasil dianalisis melalui pembacaan absorbansi menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 595 nm. Diperoleh rendemen ekstrak paling tinggi sebesar 10,9% (b/b) untuk pelarut etanol 90%. Hasil pengujian membuktikan bahwa variasi konsentrasi (etanol 70, 80, dan 90%) tidak memberikan hasil yang beda nyata, namun persentase sel hidup terendah terlihat dari ekstrak etanol 70% pada seri konsentrasi 1000  $\mu\text{g/ml}$  yaitu sebesar 4,803% untuk sel HeLa dan 7,32% untuk sel MCF-7. Hasil uji fitokimia secara kualitatif menunjukkan bahwa ekstrak daun tapak dara mengandung alkaloid dan hasil uji vinkristin secara kuantitatif diperoleh kadar sebesar 0,14 mg/ml dari ekstrak etanol 70%, 0,11 mg/ml dari ekstrak etanol 80% dan 0,1 mg/ml dari ekstrak etanol 90% yang diujikan menggunakan HPLC. Nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh pada sel HeLa dengan konsentrasi sampel 70% ialah sebesar 105,53  $\mu\text{g/ml}$ , konsentrasi sampel 80% ialah sebesar 296,94  $\mu\text{g/ml}$ , konsentrasi sampel 90% sebesar 1.245  $\mu\text{g/ml}$ , sedangkan Nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh pada sel MCF-7 dengan ekstrak etanol 70% sebesar 380,48  $\mu\text{g/ml}$ , ekstrak etanol 80% sebesar 529,79  $\mu\text{g/ml}$ , dan konsentrasi ekstrak etanol 90% sebesar 409,05  $\mu\text{g/ml}$ . Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol tapak dara memiliki nilai penghambatan terbaik pada ekstrak etanol 70%.

Kata Kunci: sitotoksitas, ekstrak daun tapak dara, antikanker, etanol, vinkristin

**ABSTRACT**

Vinca leaves contains more than 70alkaloids, one of them is vincristine which was useful as anticancer. In this study the cytotoxicity was tested extracts of leaves of vinca against cervical cancer cells (HeLa) and breast cancer cells (MCF-7) with a variation

of ethanol concentrations of 70, 80 and 90%. The extraction method used was maceration. Maceration was done for 5 days and remaceration on the 3rd day. The extract was then tested qualitatively and quantitatively. Qualitative test performed with phytochemical assay (alkaloids assay) and quantitative assay was performed using HPLC. The extracts were tested on HeLa cells and MCF-7 to obtain  $IC_{50}$  values by MTT method and the results were analyzed by absorbance using ELISA reader with a wavelength of 595 nm. Highest yield obtained extract of 10.9% (w/w) was ethanol 90%. The test results proved that variations of ethanol concentrations (70, 80, and 90%) did not give significant difference, but the percentage of living cells lows seen from the 70% ethanol extract on a series concentration of 1000  $\mu\text{g/ml}$  in the amount of 4.803% for HeLa cells and 7,32% for MCF-7 cells. Qualitative phytochemical test results showed that the extract of leaves of vinca alkaloids vincristine and quantitative test results obtained by concentration of 0.14 mg/ml of 70% ethanol extract, 0.11 mg/ml of 80% ethanol extract and 0.1 mg/ml of 90% ethanol extract were tested using HPLC.  $IC_{50}$  values were obtained in HeLa cells with a sample concentration of 70% is at 105.53  $\mu\text{g/ml}$ , the concentration of the sample was 80% amounted to 296.94  $\mu\text{g/ml}$ , the concentration of the sample 90% of 1245  $\mu\text{g/ml}$ , whereas the  $IC_{50}$  value obtained in MCF-7 cells with 70% ethanol extract of 380.48  $\mu\text{g/ml}$ , 80% ethanol extract of 529.79  $\mu\text{g/ml}$ , and the concentration of ethanol extract 90% amounting to 409.05  $\mu\text{g/ml}$ . The results showed that the ethanol extract of vinca has the best inhibition values at 70% ethanol extract.

Keywords: cytotoxicity, leaf extract tapak dara, anticancer, ethanol, vincristin

## PENDAHULUAN

Dalam dekade terakhir, pemanfaatan bahan alam telah banyak dimanfaatkan baik sebagai obat maupun tujuan lain atau lebih dikenal dengan slogan *back to nature*. Efek samping yang ditimbulkan dari bahan alam cenderung lebih kecil dibandingkan dengan obat-obatan modern (kimia) (Ningsih dkk., 2014). Menurut Thabarani (2012), pemanfaatan bahan alam seperti tapak dara kini marak dikembangkan.

Terkandungnya senyawa alkaloid seperti vinkristin dan vinblastin diklaim dapat menghambat sel-sel kanker. Tapak dara umumnya dijadikan sebagai tanaman hias dan dapat hidup di berbagai tempat dengan iklim yang berbeda-beda dan ditemukan hingga ketinggian 800 mdpl. Pemanfaatan tumbuhan tapak dara (*Catharanthus roseus*) saat ini telah digunakan untuk mengobati berbagai penyakit, beberapa diantaranya seperti hipertensi, diabetes, dan leukimia (Dalimartha, 2008).

Temuan terkini adanya kandungan vinblastin (VLB) dan vinkristin (VCR) pada tapak dara (*Catharanthus roseus*) dilaporkan dapat membunuh sel-sel kanker (antikanker) (Pandriangan, 2006). Kanker ialah penyebab kematian nomor dua di dunia setelah penyakit kardiovaskular. Diperkirakan sekitar 7,5 juta orang meninggal akibat kanker dan lebih dari 70 % kematian terjadi di negara miskin dan berkembang. Jenis kanker tertinggi ialah kanker payudara (38 per 100.000 perempuan) dan kanker leher rahim (16 per 100.000 perempuan). Dewasa ini pengobatan kanker yang diberikan pada pasien tidak hanya berupa kemoterapi, namun terdapat beberapa metode yang dilakukan seperti radioterapi, pembedahan, serta terapi dalam bentuk hormonal (Jong, 2005). Akan tetapi, pengobatan yang umum dilakukan ialah kemoterapi. Kemoterapi ialah suatu proses pengobatan terhadap pasien kanker menggunakan obat-obatan atau senyawa yang bertujuan untuk menghambat pertumbuhan sel kanker (Noorwati, 2007). Zat kimia kemoterapi yang umum digunakan ialah cisplatin dan doksorubisin (Ishida dkk., 2002). Namun, terdapat efek samping yang ditimbulkan akibat kemoterapi dikarenakan senyawa tersebut tidak hanya membunuh sel kanker tetapi juga sel normal (Noorwati, 2007)

Efek samping yang ditimbulkan oleh pasien kemoterapi bermacam-macam tergantung senyawa kemoterapi yang diberikan. Berdasarkan *National Cancer Institute*, terjadinya efek samping diakibatkan oleh kemoterapi berbasis antrasiklin seperti adriamisin atau doksorubisin, yang menyebabkan mual, muntah, stomatitis, diare, rentan terinfeksi penyakit, trombositopenia, neuropati, alopesia (kerontokan rambut) dan myalgia (Partridge dkk., 2001). Oleh karena begitu banyaknya efek samping yang ditimbulkan dari pengobatan kimia (modern) terhadap kanker maka perlu dilakukan penelitian terhadap bahan-bahan alam yang diharapkan tidak menimbulkan efek samping. Daun tapak dara (*Catharanthus roseus*) yang diklaim memiliki aktivitas antikanker karena kandungan kimianya seperti vinblastin dan vinkristin yang tinggi yang terdapat pada daunnya, merupakan komponen utama penyusun obat kanker modern saat ini (Indrayani, 2006). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui lebih lanjut khasiat daun tapak dara yang memiliki peluang sebagai aktivitas antikanker untuk dikembangkan sebagai senyawa kemoterapi terhadap *cell line* HeLa dan MCF-7 dengan menggunakan metode ekstraksi dengan variasi konsentrasi pelarut etanol.

## METODE PENELITIAN

Penelitian berlangsung dari bulan September 2016 hingga Januari 2017 yang dilakukan di Laboratorium Teknobil Industri Universitas Atma Jaya Yogyakarta, Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Atma Jaya Yogyakarta dan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dan Laboratorium Unit V Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini ialah Rancangan Acak Kelompok dengan perlakuan tiga konsentrasi pelarut etanol (70, 80, dan 90%) tiga kali pengulangan yang diujikan pada *cell line* HeLa dan MCF-7. Sebagai pembanding digunakan obat kemoterapi yaitu vinkristin sulfat serta kontrol negatif ialah kontrol sel dan kontrol medium.

### Preparasi sampel daun tapak dara

Daun tapak dara berwarna hijau diambil daunnya dengan 2-3 cm tangkai yang tersisa di daun sebanyak 6 kg. Daun dicuci dengan air mengalir kemudian ditiriskan agar kotoran dan debu yang menempel dapat hilang lalu dikeringanginkan kemudian di oven pada suhu 60<sup>0</sup> c (Soriton dkk., 2014, dengan modifikasi)

### Pembuatan serbuk daun tapak dara

Daun tapak dara yang telah dicuci dan dikeringkan kemudian dipotong kecil-kecil tipis, lalu dikeringkan kembali menggunakan oven dengan suhu 60<sup>0</sup>c selama 14 hari, kemudian tapak dara dihaluskan menggunakan blender dan diayak dengan ayakan 90 mesh(Soriton dkk., 2014, dengan modifikasi)

### Ekstraksi maserasi oleh etanol

Pembuatan ekstrak etanol dilakukan dengan metode maserasi. Proses ekstraksi maserasi dilakukan dengan perbandingan serbuk: pelarut yaitu 1:5. Serbuk tapak dara kering yang telah diayak, diambil dan ditimbang sebanyak 150 gram, kemudian dibagi ke dalam 3 wadah lalu diekstraksi dengan masing-masing wadah 250 ml etanol (70, 80, dan 90%) lalu diremaserasi dengan perbandingan serbuk: pelarut yaitu 1:5(Soriton dkk., 2014, dengan modifikasi).Filtrat 1 dan filtrat 2 kemudian disatukan dan diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 70<sup>0</sup>C sampai kira-kira volume ¼ dari volume awal kemudian dilakukan pengentalan dengan *waterbath* pada suhu 60<sup>0</sup>C hingga didapatkan ekstrak kental. Kemudian dihitung beratnya lalu di *wrap* aluminium foil, dan rendemen ekstrak yang dihasilkan dihitung dengan rumus (Mardaningsih dkk., 2012) :

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak (g)}}{\text{Berat bahan (g)}} \times 100\%$$

### Analisis Fitokimia

Ekstrak sebanyak 0,1 gram dimasukkan ke tabung reaksi, kemudian 10 ml CHCl<sub>3</sub> dan 25 ml amoniak ditambahkan. Larutan disaring dan dimasukkan ke tabung reaksi lain dan ditambah 5 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N, kemudian dikocok. Lapisan atas yang terbentuk diambil dan dimasukkan ke dalam 3 tabung reaksi, kemudian ditambah satu reagen untuk tiap tabung reaksi. Reagen yang digunakan yaitu reagen Meyer, Wagner, dan Dragendorff.(McMurry, 2004).

### Uji Kuantitatif Dengan HPLC

Ekstrak sebanyak 0,1 gram dimasukkan kedalam *microtube*, kemudian ditambahkan 1 ml metanol. Vinkristin sulphate 0,1 ml ditambahkan 0,9 ml metanol. Ekstrak kemudian diencerkan kembali dengan mengambil 1 ml lalu ditambahkan metanol sebanyak 10 ml.

Vinkristin sulphate juga kembali diencerkan dengan diambil sebanyak 1 ml lalu ditambahkan metanol 10 ml. Setelah diencerkan, masing-masing ekstrak dan vinkristin sulphate diambil sebanyak 1 ml lalu ditambahkan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  sebanyak 1 ml. Fase gerak yang digunakan adalah  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dengan kecepatan fase gerak 1 ml per menit. Panjang gelombang yang digunakan adalah 205 nm. Analisis vinkristin dari sampel dilakukan dengan menyuntikkan ekstrak sampel 20  $\mu\text{L}$  ke dalam kolom. Analisis kuantitatif dilakukan dengan cara mengkonversi luas area sampel dengan luas area standar yang telah diketahui konsentrasinya (Iskandar dan Iriawati, 2016 dan Pandiangan, 2010).

### **Pembuatan Medium Cair**

Medium padat (DMEM dan RPMI) yang akan digunakan disiapkan terlebih dahulu. Sebanyak 950 ml akuabides steril disiapkan dan dituang ke dalam gelas beker, lalu diletakkan dalam LAF. Medium bubuk dituang ke dalam akuabides steril ke dalam gelas beker, kemudian diaduk hingga rata. Bagian dalam pembungkus media bubuk dibilas dengan akuabides. Cairan dituangkan ke dalam gelas beker diatas.  $\text{NaHCO}_3$  ditambahkan sebanyak 2,2 gram untuk setiap liter medium yang dibuat kemudian diaduk hingga rata. Akuabides steril ditambahkan hingga volume 1000 ml, kemudian aduk dengan magnetik stirer hingga semua media padat dan  $\text{NaHCO}_3$  dapat larut (Hermawan, 2010).

### **Thawing sel**

Medium komplet (MK) diambil sebanyak 3 ml ke dalam tabung konikal yang baru. Ampul diambil yang berisi sel dari tangki nitrogen cair. Suspensi sel dicairkan pada suhu kamar ( $25^\circ\text{C}$ ) hingga tepat mencair. Suspensi sel diambil dengan mikropipet 1000  $\mu\text{l}$ , kemudian dimasukkan tetes demi tetes ke dalam MK. Tutup tabung konikal dengan rapat lalu disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Kemudian, tabung konikal dibuka lalu supernatan dibuang dan ditambahkan MK baru sebanyak 4 ml, sel diresuspensi kembali hingga homogen. Masing-masing suspensi sebanyak 2 ml dipindah ke dalam 2 dish yang berbeda, lalu ditambahkan kembali 5 MK ke dalam dish dan dihomogenkan. Amati kondisi sel di bawah *inverted microscope*, dihitung kerapatannya kemudian difoto (Hermawan, 2010)

### **Pemeliharaan sel**

Uji aktifitas sitotoksik dilakukan dengan mengkultur Sel HeLa dan MCF-7 dengan medium komplet (terdiri dari FBS, amphotericin B, penstrep serta RPMI atau DMEM, penggantian medium dilakukan setiap dua hari sekali. Pemeliharaan sel HeLa dilakukan dalam inkubator  $\text{CO}_2$  5% dengan suhu  $37^\circ\text{C}$  (Nathanael dkk., 2015, dengan modifikasi)

### **Panen sel**

Sel diambil dari inkubator  $\text{CO}_2$ , amati kondisi sel. Sel dipanen setelah sel 80% konfluen. Medium dibuang dengan menggunakan mikropipet kemudian sel dicuci dengan PBS dan diulang sebanyak 2 kali. Tripsin-EDTA ditambahkan secara merata dan diinkubasi dalam inkubator selama 3 menit. Lalu dihitung jumlah sel kemudian ditambahkan hingga mencapai volume 10 ml. Selanjutnya, aliquot sampel dengan suspensi sel sebanyak 10  $\mu\text{L}$ , lalu diambil dan diteteskan pada hemositometer dan dihitung jumlah selnya di bawah *inverted microscope*. Setelah kerapatan sel diketahui, maka dapat dihitung volume sel yang harus diambil sesuai kebutuhan. Sel yang digunakan untuk pengujian ditempatkan pada tabung konikal 30 mL, ditambah medium lengkap sesuai perhitungan, dan dihomogenasi. Suspensi sel sebanyak 100  $\mu\text{L}$  diambil kemudian diteteskan dalam *microplate* 96 well. Disisakan 6 sumuran kosong sebagai kontrol medium. Suspensi sel HeLa dan MCF-7 yang telah

dimasukkan kedalam *microplate* 96 well selanjutnya diletakkan dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 37°C selama semalam (*over night*) (Junedi, 2009)

### **Perlakuan dengan sampel**

Sampel ditimbang sebanyak 10 mg. Kemudian suspensi sel dilarutkan dengan DMSO sebanyak 100 µL kemudian vortex. Medium lengkap ditambahkan sebanyak 900 µL kemudian diletakkan pada *microtube*. Kemudian seri konsentrasi 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 dan 16,125 µg/ml sedangkan terhadap sel MCF-7 ialah 1000, 500, 50, 5, 2,5, dan 0,5 µg/ml serta vinkristin dibuat seri konsentrasi 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12,5 µg/ml dan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali untuk masing-masing konsentrasi sampel dan vinkristin. Selanjutnya diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 37°C selama semalam (*over night*) (Junedi, 2010)

### **Uji Sitotoksik dengan Metode MTT**

Suspensi sel yang sudah diberi perlakuan ekstrak, diamati keadaannya di bawah *inverted microscope* lalu didokumentasikan. Sementara itu, disiapkan reagen MTT, medium dan tabung konikal. Medium dituang sebanyak 9 ml kemudian ditambahkan reagen MTT sebanyak 1 ml serta dihomogenkan. Sebelum sumuran diberi MTT, medium dalam sumuran dibuang lalu masing-masing sumuran ditambahkan 100 µL MTT 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida.. Setelah MTT, suspensi diinkubasi pada suhu 37°C, CO<sub>2</sub> 5%, selama 4 jam. Reaksi MTT dihentikan dengan penambahan SDS 1% dalam 0,1N HCl sebanyak 100µL/sumuran. Setelah diberi *stopper*, *microplate* ditutup dengan kertas lalu diinkubasi pada suhu kamar (25°C) selama semalam (Putri, 2013)

### **Pembacaan hasil dan Analisis Data**

Nilai absorbansi dibaca dengan ELISA reader  $\lambda=595$  nm setelah didiamkan pada ruangan gelap pada suhu kamar (25°C) selama semalam. Persentase penghambatan sel yang diperoleh dianalisis dengan ANAVA dilanjutkan dengan DMRT untuk mengetahui beda nyata antar konsentrasi perlakuan. ANAVA dan DMRT dianalisis menggunakan program SPSS18.0.(Nathanael dkk., 2015, dengan modifikasi)

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Bahan alam yang digunakan pada penelitian ini ialah tanaman tapak dara (*Catharanthus roseus*), sedangkan bagian organ yang digunakan ialah daun organ tanaman yang digunakan yaitu daun dengan kriteria berwarna hijau muda segar dengan urutan ketiga sampai kelima dari pucuk tangkai serta menyisakan tangkai 2 hingga 3 cm (Rohyani dkk., 2015). Menurut Kementerian Pertanian (2012), daun tapak dara terlebih dahulu disortasi dengan tujuan untuk memperoleh kualitas baik dengan kriteria daun harus berwarna hijau segar dan daun tidak ada bercak terlebih koyak. Setelah sortasi dilakukan maka daun dicuci dengan air mengalir hal ini kemudian dikeringanginkan dan pengeringan dilanjutkan menggunakan oven dengan suhu 50° C. Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini ialah maserasi menggunakan pelarut etanol 70, 80, dan 90%. Pemilihan metode maserasi karena tergolong metode sederhana yang dapat melarutkan senyawa metabolit sekunder dengan bahan yang sudah halus direndam hingga pelarut menembus dinding sel dan kemudian masuk ke dalam sel tanaman dan menarik senyawa metabolit sekunder yang ada di dalamnya. Kelebihan ekstraksi menggunakan metode maserasi ialah karena dapat menghindari bahan alam yang mudah terurai serta rusaknya senyawa-senyawa termolabil pada bahan (Mukhriani, 2014). Proses ekstraksi yang dilakukan dalam penelitian ini menggunakan perbandingan serbuk dan pelarut 1:5. Maserasi dilakukan selama 5 hari dengan tambahan proses remaserasi dihari ketiga dengan tujuan agar senyawa yang dihasilkan menjadi lebih banyak dan mencegah adanya kejenuhan pada pelarut, yang dapat mengakibatkan senyawa target dalam bahan tidak terambil (Febriani dkk., 2015). Nilai rendemen ekstrak tiap pelarut dapat diperoleh berdasarkan hasil ekstraksi yang dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai Rendemen Ekstrak Daun Tapak Dara (*Catharanthus roseus*)

Pelarut	Berat (gram)			Rendemen Ekstrak (%)
	Awal	Akhir	Ekstrak	
Etanol 70%	35,9	39,88	3,98	7,96
Etanol 80%	31,11	35,41	4,3	8,6
Etanol 90%	33,43	38,88	5,45	10,9

Berdasarkan Tabel 1 diketahui bahwa pelarut etanol 70% memiliki rendemen ekstrak sebanyak 7,96%, pelarut etanol 80% memiliki rendemen ekstrak sebanyak 8,6% dan pelarut etanol 90% memiliki rendemen ekstrak sebanyak 10,9%. Dari hasil tersebut maka diketahui bahwa etanol 90% menghasilkan metabolit sekunder dalam hal ini ekstrak yang paling banyak sedangkan pelarut etanol 70% menyari senyawa metabolit sekunder paling sedikit. Ekstrak etanol 90% menghasilkan rendemen ekstrak paling banyak.

Senyawa kimia yang terkandung dalam tumbuhan atau yang disebut dengan kandungan fitokimia merupakan bagian dari metabolit sekunder, sehingga untuk mengetahui dan memastikan adanya kandungan senyawa kimia pada tumbuhan maka dilakukan pengujian fitokimia secara kualitatif maupun kuantitatif (Rohyani dkk., 2015). Menurut Simaremare (2014), pengujian alkaloid memakai prinsip hasil akhir yakni terdapatnya endapan yang disebabkan karena adanya pergantian ligan. Uji alkaloid yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan tiga pereaksi seperti Wagner, Mayer, dan Dragendorff.



Tabel 2. Hasil Uji Kualitatif Fitokimia Ekstrak Daun Tapak Dara (*Catharanthus roseus*)

Sampel	Endapan yang timbul dengan penambahan		
	Wagner	Meyer	Dragendorf
Ekstrak etanol 70%	+	+	+
Ekstrak etanol 80%	++	++	++
Ekstrak etanol 90%	+++	+++	+++

Keterangan:

- + = menunjukkan kandungan alkaloid yang agak banyak
- ++ = menunjukkan kandungan alkaloid yang banyak
- +++ = menunjukkan kandungan alkaloid yang sangat banyak

Berdasarkan Tabel 2 hasil uji alkaloid secara kualitatif yang diperoleh pada penelitian ini seluruh ekstrak etanol dengan variasi konsentrasi bereaksi positif terhadap reagen Mayer, Dragendorf dan Wagner pada uji alkaloid. Namun, tanda + (positif) yang tercantum mewakili seberapa banyak endapan yang timbul, pada penelitian ini diperoleh bahwa kandungan alkaloid terbanyak terdapat pada etanol 90%, yang berarti bahwa semakin tinggi konsentrasi pelarut maka akan semakin banyak kandungan alkaloid yang terekstrak.

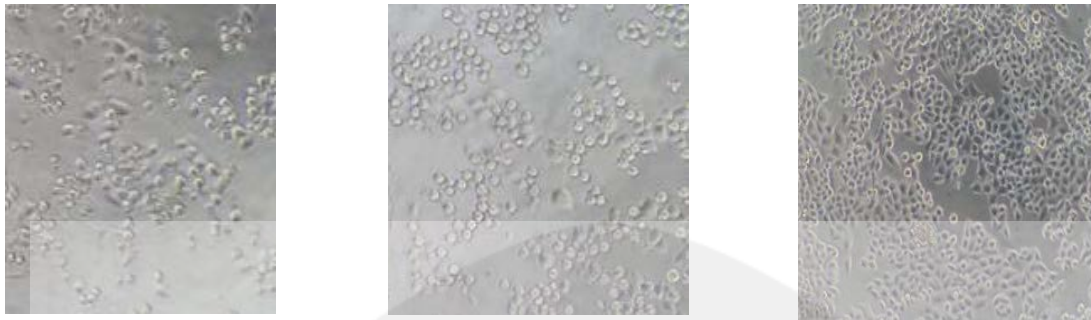
Hasil uji kuantitatif vinkristin diperoleh kadar sebesar 0,14 mg/ml vinkristin dari ekstrak etanol 70% dengan waktu retensi 3,706 menit, 0,11 mg/ml vinkristin dari ekstrak etanol 80% dengan waktu retensi 3,687 menit dan 0,1 mg/ml vinkristin dari ekstrak etanol 90% dengan waktu retensi 3,673 menit yang diujikan menggunakan HPLC dengan standar berupa obat kemoterapi yaitu vinkristin sulfat dan dihasilkan waktu retensi 3,974 menit.

Penelitian ini efek menggunakan seri konsentrasi yang digunakan terhadap sel HeLa ialah 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625 µg/ml, sedangkan terhadap sel MCF-7 ialah 1000; 500; 50; 5; 2,5; 0,5 µg/ml dan vinkristin sulfat 800, 400, 200, 100, 50, 25, dan 12,5 µg/ml. Dalam pengujian sel terdapat perlakuan kontrol medium, kontrol sel serta kontrol positif sebagai perbandingan yaitu vinkristin sulfat. Kontrol medium berfungsi sebagai kontrol untuk memastikan bahwa medium benar-benar bersih tanpa kontaminan. Kontrol sel atau kontrol negatif berfungsi sebagai pembanding, karena pada perlakuan ini ekstrak tidak diberi perlakuan apapun dan kontrol positif berfungsi sebagai pembanding juga antara keefektifan ekstrak dengan obat kanker komersil. Morfologi sel setelah diberi ekstrak etanol 70, 80, dan 90% dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2 berikut.



Gambar 1. Sel MCF-7 yang telah diberi ekstrak etanol (Kiri ke kanan 70,80, dan 90%)(Dokumentasi pribadi, 2016)

Keterangan: Sel yang telah diberi ekstrak etanol seri konsentrasi 1000 µg/ml (Kiri ke kanan 70,80, dan 90%) dengan perbesaran 10 x 10 menunjukkan hasil bahwa etanol 70% memberikan penghambatan terbaik dibandingkan dengan etanol 80% dan etanol 90% yang ditunjukkan oleh bentuk sel. Bentuk sel pada ekstrak etanol 70% cenderung pipih (sel mati), ekstrak etanol 80 dan 90% cenderung bulat (sel hidup)



Gambar 2. Sel HeLa yang telah diberi ekstrak etanol (Kiri ke kanan 70,80, dan 90%)  
(Dokumentasi pribadi, 2016)

Keterangan: Sel yang telah diberi ekstrak etanol seri konsentrasi 1000 µg/ml (Kiri ke kanan 70,80, dan 90%) dengan perbesaran 10 x 10 menunjukkan hasil bahwa etanol 70% memberikan penghambatan terbaik dibandingkan dengan etanol 80% dan etanol 90% yang ditunjukkan oleh bentuk sel. Bentuk sel pada ekstrak etanol 70% cenderung pipih (sel mati), ekstrak etanol 80 dan 90% cenderung bulat (sel hidup)

Berdasarkan Gambar 1 dan 2 membuktikan bahwa semakin tinggi konsentrasi yang diberikan maka akan semakin rendah pula kemampuan menghambatnya. Hal ini juga dapat berkaitan dengan adanya proses difusi. Difusi merupakan proses perpindahan molekul yang bergerak dari konsentrasi tinggi ke konsentrasi yang lebih rendah (Hartanto, 2007). Dalam hal ini sel yang memiliki konsentrasi tinggi akan mudah larut dalam ekstrak etanol dengan konsentrasi rendah. Konsentrasi etanol dalam penelitian ini dibuat dengan beberapa variasi konsentrasi yaitu 70, 80, dan 90%. Sehingga dengan demikian ekstrak daun tapak dara dengan konsentrasi 70% lebih mampu menghambat sel lebih baik.

Uji sitotoksik dilakukan untuk mendapatkan nilai  $IC_{50}$ .  $IC_{50}$  ialah suatu nilai konsentrasi yang menunjukkan hambat proliferasi sel sebanyak 50% serta menunjukkan adanya potensi toksik senyawa alam yang diekstrak terhadap sel (Meiyanto, 2002). Semakin besar harga  $IC_{50}$  maka senyawa tersebut semakin tidak toksik. Nilai  $IC_{50}$  dapat dilihat pada Tabel 3 dan 4 di bawah ini

Tabel 3. Nilai  $IC_{50}$  sel HeLa dan MCF-7 oleh ekstrak etanol

Konsentrasi	$IC_{50}$ Ekstrak Etanol Daun Tapak Dara	
	MCF-7	HeLa
70%	380,48 µg/ml	105,53 µg/ml
80%	529,79 µg/ml	296,94 µg/ml
90%	409,05 µg/ml	1.245 µg/ml

Tabel 4. Nilai  $IC_{50}$  sel HeLa dan MCF-7 oleh vinkristin

$IC_{50}$ Vinkristin	
HeLa	MCF-7
457,95 µg/ml	457,95 µg/ml

Berdasarkan Tabel 3 dan 4 diatas diperoleh nilai  $IC_{50}$  dari ekstrak etanol 70, 80 dan 90% terhadap sel HeLa ialah berturut-turut sebesar 105,53; 296,94; 1.245µg/ml dan HeLa vinkristin pada sel sebesar 457,95µg/ml serta ekstrak etanol 70, 80 dan 90% terhadap sel MCF-7 ialah berturut-turut sebesar 380,48; 529,79; 409,05 µg/ml dan MCF-7 vinkristin pada

sel sebesar 457,95 µg/ml. Hal ini sejalan dengan uji MTT yang dapat dilihat melalui warna. Ekstrak etanol terbaik yang diperoleh pada penelitian ini ialah ekstrak etanol 70% pada sel HeLa. Ekstrak etanol terbaik yang diperoleh pada penelitian ini ialah ekstrak etanol 70% pada sel HeLa. Hasil ini juga dapat disebabkan karena senyawa vinkristin dapat membunuh sel kanker, namun spesifik menghambat pertumbuhan sel kanker *osteosarcoma*, *lymphosarcoma*, dan myeloma (Wijayakusuma, 2005).

Tabel 5. Hasil Analisis Uji Sitotoksisitas Ekstrak Daun Tapak Dara Terhadap sel HeLa dan MCF-7

Perlakuan	Persen sel hidup (%) pada seri konsentrasi 1000 µg/ml	
	Sel HeLa	Sel MCF-7
Ekstrak etanol 70%	4,803	7,32
Ekstrak etanol 80%	3,9	11,72
Ekstrak etanol 90%	21,87	3,06
Vinkristin Sulfat	44,18333	33,83
Kontrol sel	100,00	100,00
Rata-rata	18,69 <sup>A</sup>	13,98 <sup>A</sup>

Keterangan: Angka dengan huruf sama menggambarkan tidak terdapat beda nyata pada tingkat kepercayaan 95%

Tabel 5 menunjukkan hasil Analisis Uji Sitotoksisitas Ekstrak Daun Tapak Dara Terhadap sel HeLa dan MCF-7 menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% daun tapak dara paling mampu menghambat sel kanker karena sel hidup yang diperoleh hanya sebesar 4,8 % untuk sel HeLa dan sebesar 7,3% untuk sel MCF-7 dibandingkan dengan kedua pelarut lain hal ini dikarenakan kandungan vinkristin terbesar pada pelarut etanol 70%. Hasil tidak beda nyata yang didapat pada penelitian ini ialah bahwa variasi pelarut ekstrak tapak dara yang diberikan terhadap sel HeLa dan MCF-7 tidak memberikan efek yang signifikan, hal ini sama apabila dibandingkan dengan kontrol positif. Jika dilihat berdasarkan nilai  $IC_{50}$ , kedua sel tersebut juga tidak memberikan hasil yang baik karena rata-rata nilai  $IC_{50}$  yang dihasilkan ialah lebih dari 100. Menurut Kamubhawa dkk., (2000) nilai  $IC_{50} \leq 100$  µg/ml dari suatu ekstrak bahan alam dapat dikatakan memiliki potensi antiproliferasi, sedangkan batas ambang yang ditetapkan untuk bahan alam yang dapat dikembangkan sebagai antikanker yaitu  $\leq 50$  µg/ml (Kamubhawa dkk., 2000) sedangkan ekstrak dikatakan tidak aktif sebagai antikanker jika nilai  $IC_{50} > 500$  µg/ml. Hasil ini dikarenakan bahwa penggunaan vinkristin tidak bisa berdiri sendiri sebagai obat antikanker namun harus dikombinasikan dengan obat lain seperti antrasiklin, siklofosamid, aprepitant, deksametason, serta ondansetron (Rahmah, 2009).

## SIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan penelitian Sitotoksitas Ekstrak Daun Tapak Dara (*Catharanthus roseus*(L.) G. Don. Terhadap *Cell Line* Kanker Serviks (HeLa) dan *Cell Line* Kanker Payudara (MCF-7), disimpulkan bahwa 1) Ekstrak daun tapak dara (*Catharanthus roseus*) bersifat sitotoksik terhadap sel HeLa dan MCF-7 pada konsentrasi 70% sedangkan pada konsentrasi 80% ekstrak bersifat sitotoksik lemah dan pada konsentrasi 90% ekstrak tidak bersifat sitotoksik terhadap sel HeLa dan MCF-7, 2)  $IC_{50}$  yang diperoleh dari ekstrak etanol 70, 80 dan 90% terhadap sel HeLa ialah berturut-turut sebesar 105,53; 296,94; dan 1.245  $\mu\text{g/ml}$  serta ekstrak etanol 70, 80 dan 90% terhadap sel MCF-7 ialah berturut-turut sebesar 380,48; 529,79; dan 409,05  $\mu\text{g/ml}$ .

Saran yang diajukan untuk penelitian selanjutnya terkait dengan aktivitas antikanker daun tapak dara (*Catharanthus roseus*) antara lain 1) Perlu dilakukan uji fraksinasi bertingkat agar senyawa vinkristin yang disasar benar-benar dapat dipisahkan, 2) Perlu dilanjutkan uji apoptosis untuk mengetahui jalur kematian sel.



## DAFTAR PUSTAKA

- Dalimartha, S. 2008. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*. Trubus Agriwidya, Jakarta.
- Febriani, D., Mulyanti, D., dan Rismawati, E. 2015. Karakterisasi simplisia dan ekstrak etanol daun sirsak (*Annona Muricata* Linn). *Prosiding Penelitian Sivitas Akademika Unisba (Kesehatan dan Farmasi)* 2: 475-480.
- Hermawan, A. 2010. *Prosedur tetap menumbuhkan sel dari tangki nitrogen cair (Cell Thawing)*. Cancer Chemoprevention Research Center, Yogyakarta.
- Hartanto, W.W. 2007. *Terapi Cairan dan Elektrolit Periopeartif*. Bagian Farmakologi Klinik dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Padjajaran, Bandung.
- Indrayani, L. 2006. Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L.Val) Terhadap Larva Udang Artemia. *Jurnal penelitian Hayati* 12:57-61
- Ishida, S., Lee,J., Thiele,D.J., dan Herskowitz, I. 2002. Uptake Of The Anticancer Drug Cisplatin Mediated By The Copper Transporter Ctr1 In Yeast And Mammals. *Proceedings Of The National of Science Of The United Ststes Of America* 99 (2):14298–14302
- Jong, W. 2005. *Buku Ajar Ilmu Bedah*. Edisi 2. EGC, Jakarta.
- Junedi, S. 2010. *Prosedur tetap panen sel*. Cancer Chemoprevention Research Center, Yogyakarta.
- Junedi, S. 2010. *Prosedur tetap perhitungan sel*. Cancer Chemoprevention Research Center, Yogyakarta.
- Junedi, S. 2010. *Prosedur tetap preparasi sampel*. Cancer Chemoprevention Research Center, Yogyakarta.
- Kamuhabwa, A., Nshimo, C., dan de Witte, P. 2000. Cytotoxicity of Some Medicinal Plant Extracts Used in Tanzanian Tradisional Medicine. *Jurnal Ethnopharmacol*70: 143-149
- Kementerian Pertanian. 2012. *Standar Operasional Prosedur (SOP) Pascapanen Tanaman Obat Daun*. Kementerian Pertanian Direktorat Jenderal Hortikultura Direktorat Budidaya dan Pascapanen Sayuran dan Tanaman Obat, Jakarta.
- Mardaningsih, F., Andriani, M.A.M., dan Kawiji. 2012. Pengaruh konsentrasi etanol dan suhu spray dryer terhadap karakteristik bubuk klorofil daun alfalfa (*Medicago sativa* L.) dengan menggunakan binder maltodekstrin. *Jurnal Teknosains Pangan* 1(1) : 110-117
- Mc Murry, J. 2004. *McMurry Fay Chemistry*. Pearson Education International, USA.
- Meiyanto, E. 2002. *Biologi Molekuler*. Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta.
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*7(2) : 361-367
- Nathanael,J. 2015. Uji Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Kulit Jeruk Purut (*Citrus hystrix*) Pada Sel HeLa Cervical Cancer Cell Line. *Skripsi*. Universitas Atma Jaya Yogyakarta, Fakultas Teknobiologi, Yogyakarta.

- Ningsih, D. R., Zusfahair, dan Purwati. 2014. Potensi ekstrak daun kamboja (*Plumeria alba* L.) sebagai antibakteri dan identifikasi golongan senyawa bioaktifnya. *Jurnal Molekul* 9(2): 101-109.
- Noorwati, S. 2007. *Kemoterapi, Manfaat dan Efek Samping*. Rumah Sakit Kanker Dharmais, Jakarta.
- Pandiangan, D. 2006. Respons Pertumbuhan Kalus *Catharanthus roseus* yang diberi perlakuan triptofan. *Jurnal Biotika* 5: 49-56
- Pandiangan, D. 2010. Perubahan Morfologi dan Anatomi Kalus *Catharanthus roseus* dengan Perlakuan Triptofan. *Jurnal Bioslogos* 2(1) : 45-50
- Partridge, A.H., Burstein, H.J., Winer, E.P. 2001. Side Effects of Chemotherapy and Combined Chemohormonal Therapy in Women With Breast Cancer. *Journal of The National Cancer Institute Monograph*. 30: 42-135
- Putri, H. 2014. *Protokol Uji Sitotoksik Metode MTT*. Cancer Chemoprevention Research Center, Yogyakarta.
- Rahmah, D.S. 2009. Evaluasi penggunaan obat antimuntah pada pasien retinoblastoma anak yang menjalani kemoterapi di rumah sakit kanker dharmais. *Indonesian journal of cancer* 3(1) 1-4
- Rohyani, I. S., Aryanti, E., dan Suripto. 2015. Kandungan fitokimia beberapa jenis tumbuhan lokal yang dimanfaatkan sebagai bahan baku obat di Pulau Lombok. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia* 1(2): 388-391.
- Simaremare, E. S. 2014. Skrining fitokimia ekstrak etanol daun gatal (*Laportea decumana* (Roxb.) Wedd). *Pharmacy* 11(1): 98-107.
- Soriton, H., Paulina, V.Y.Y., dan Lolo, W.A. 2014. Uji Efektivitas Ekstrak Etanol Daun Tapak Dara (*Catharanthus roseus* (L.) G.Don) Terhadap Penurunan Kadar Gula Darah Tikus Putih Jantan Galur Wistar (*Rattus norvegicum* L.) yang Diinduksi Sukrosa. *Jurnal Ilmiah Farmasi* 3(3) : 162-169
- Thabarani, E.C.A. 2012. Ekstraksi Alkaloid dalam Daun Tapak Dara. *Skripsi*. Universitas Pembangunan Nasional Veteran Fakultas Teknologi Industri, Surabaya.
- Wijayakusuma. 2005. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. EGC, Jakarta.