



Johni Halim | Dewi Ranggaini

Editor : Ferry Sandra

# Potensi Ekstrak Alami

dalam Terapi Kanker Lidah



PENERBIT UNIVERSITAS TRISAKTI

# Potensi Ekstrak Alami

dalam Terapi Kanker Lidah

Johni Halim | Dewi Ranggaini

Editor : Ferry Sandra



PENERBIT UNIVERSITAS TRISAKTI

KREATOR

JUDUL DAN  
PENANGGUNG  
JAWAB

EDISI

Cetakan kesatu

PUBLIKASI

Jakarta Barat: Penerbit Universitas Trisakti, 2024

IDENTIFIKASI

SUBJEK

KLASIFIKASI

PERPUSNAS ID

# **Potensi Ekstrak Alami dalam Terapi Kanker Lidah**

Johani Halim  
Dewi Ranggaini



PENERBIT UNIVERSITAS TRISAKTI

# Potensi Ekstrak Alami dalam Terapi Kanker Lidah

## TIM PENYUSUN

Penulis:

**Johni Halim**  
**Dewi Ranggaini**

Editor:

**Ferry Sandra**

Desain dan Tata Letak:

**Dicky Gea**  
**Hasanuddin**

Cetakan Ke-1, Tahun 2024

**ISBN : 978-602-0750-61-3**

**e-ISBN : 978-602-0750-62-0**

## **Hak Cipta Dilindungi oleh Undang-undang**

Dilarang mengutip atau memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini tanpa izin tertulis dari Penerbit.

Diterbitkan oleh:

**Penerbit Universitas Trisakti**

Universitas Trisakti, Kampus A, Gedung R  
Jl. Kyai Tapa no.1, Grogol, Jakarta Barat-11440  
Anggota IKAPI, Jakarta  
<https://penerbitan.trisakti.ac.id>

Dikeluarkan oleh:

**Pusat Pembelajaran, Penerbitan dan Percetakan Digital Trisakti (PP3DT)**

Dicetak oleh:

**Percetakan Universitas Trisakti, Jakarta**

Isi diluar tanggung jawab Percetakan  
Isi buku ini menggunakan huruf Minion Pro, 11,5pt  
x, 224 hlm, 15,5 x 23 cm



## Prakata

Tanaman herbal telah menjadi salah satu warisan kekayaan alam yang tak ternilai, khususnya dalam pengobatan tradisional. Di tengah pesatnya kemajuan ilmu pengetahuan, potensi ekstrak tanaman sebagai agen antikanker semakin mendapat perhatian serius. Buku ini mengangkat hasil penelitian mendalam tentang berbagai ekstrak tumbuhan yang terbukti memiliki efek sitotoksik pada sel kanker, khususnya kanker lidah.

Berdasarkan kajian ilmiah terhadap ekstrak dari Kelakai, Bawang Dayak, Kulit Manggis, Terung Belanda, hingga Ginsenoside dan Propolis, buku ini memaparkan bagaimana senyawa-senyawa bioaktif dalam tumbuhan dapat menjadi senjata ampuh dalam memerangi perkembangan sel kanker. Melalui pendekatan studi *in vitro* dan *in vivo*, pembaca diajak untuk memahami mekanisme kerja ekstrak tanaman dalam menginduksi apoptosis, menghambat migrasi sel kanker, dan meningkatkan efektivitas terapi kemoterapi konvensional.

Dengan bahasa yang mudah dipahami namun tetap mempertahankan kekuatan ilmiah, buku ini diharapkan menjadi referensi penting bagi para peneliti, akademisi, serta praktisi kesehatan yang tertarik untuk mengeksplorasi lebih jauh potensi alam dalam bidang onkologi. Tak hanya itu, buku ini juga menyentuh nilai-nilai kearifan lokal, dengan menyoroti tanaman-tanaman yang kurang dimanfaatkan namun memiliki khasiat luar biasa bagi kesehatan.

Potensi besar dari ekstrak tanaman untuk pengobatan kanker, khususnya kanker lidah, kini hadir di hadapan Anda melalui paparan komprehensif yang inspiratif ini.



# Daftar Isi

Prakata.....	v
Daftar Isi.....	vii

## Bab 1

---

Ekstrak Kelakai: Komposisi dan Manfaat.....	1
A. Aktivitas Penangkal Radikal Bebas dan Anti-Infeksi Ekstrak Kelakai.....	1
B. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Akar Kelakai dari Kalimantan Tengah.....	17
C. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Kelakai Terhadap <i>Salmonella typhi</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i> .....	22

## Bab 2

---

Ekstrak Kelakai untuk Kanker Lidah.....	29
A. Potensi Kelakai Sebagai Antikanker dalam Perawatan Kanker Mulut.....	29
B. Penetapan Kadar Flavonoid dalam Ekstrak Daun Kelakai .....	35
C. Uji Aktivitas Sitotoksik Herba Kelakai Terhadap Sel Kanker Hati HepG2 .....	43

### Bab 3

---

Keamanan Penggunaan Ekstrak Kelakai.....	59
A. Uji Toksisitas Ekstrak Kelakai Berdasarkan Pemeriksaan Histopatologi Ginjal.....	59

### Bab 4

---

Khasiat Ekstrak Terung Belanda dalam Terapi Kanker Lidah .....	69
A. Efek Ekstrak Kulit Buah Terung Belanda terhadap Sel Kanker Lidah HSC-3 .....	69
B. Efek Ekstrak Kulit Manggis dalam Menghambat Pertumbuhan Sel Kanker Lidah .....	75

### Bab 5

---

Kulit Manggis Sebagai Agen Antikanker Lidah.....	83
A. Efek Ekstrak Etanol Kulit Manggis terhadap Apoptosis Sel Kanker Lidah Klon Supri-1, <i>in vitro</i> .....	83

### Bab 6

---

Potensi Bawang Dayak dan Tapak Liman dalam Pengobatan Kanker Lidah.....	87
A. Efek Ekstrak Umbi Bawang Dayak dalam Menghambat Migrasi Sel dan Apoptosis pada Sel Kanker Lidah.....	87
B. Ekstrak Daun Tapak Liman Meningkatkan Sensitivitas Doxorubicin pada Sel Kanker Lidah .....	95

### Bab 7

---

Ginsenoside dan Propolis sebagai Agen Antikanker.....	105
A. Ginsenoside sebagai Penghambat Migrasi dan Invasi Kanker Lidah.....	105
B. Propolis Polandia dan Efek Biologisnya terhadap Sel Kanker Lidah.....	114

## Bab 8

---

Aktivitas Antimikroba dan Antioksidan pada Tanaman Herbal.....	135
A. Aktivitas Antimikroba Tanaman Paku ( <i>Stenochlaena palustris</i> dan <i>Pteridium caudatum</i> ) Terhadap Bakteri.....	135
B. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Akar Kelakai.....	147

## Bab 9

---

Studi <i>in vivo</i> dan <i>in vitro</i> tentang Pengaruh Ekstrak Tanaman terhadap Sel Kanker Lidah.....	153
A. Studi <i>in vitro</i> Pengaruh Bawang Dayak terhadap Migrasi Sel Kanker Lidah.....	153
B. Studi <i>in vivo</i> Ekstrak Etanolik Ciplukan dalam Meningkatkan Apoptosis Sel Kanker Lidah.....	161

## Bab 10

---

Telaah Ekstrak Herbal dalam Pengobatan Penyakit Lain.....	169
A. Potensi Ekstrak Kelakai Terhadap Kadar Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- $\alpha$ ) pada Mencit yang Diinfeksi <i>Plasmodium berghei</i> .....	169
Daftar Pustaka .....	179
Profil Penulis .....	221
Profil Editor .....	223





# Bab 1

## Ekstrak Kelakai: Komposisi dan Manfaat

### A. Aktivitas Penangkal Radikal Bebas dan Anti-Infeksi Ekstrak Kelakai

---

Dalam beberapa tahun terakhir, minat masyarakat terhadap pengobatan tradisional telah meningkat karena beragam cara kerjanya yang relatif sedikit memberikan efek negatif pada manusia. Tumbuhan dengan sifat obat merupakan sumber kaya akan metabolit sekunder yang digunakan dalam berbagai pengobatan. Oleh karena itu, dan mengingat tingginya tingkat keanekaragaman hayati yang ada di Indonesia, sangat penting untuk mempelajari spesies tumbuhan potensial, termasuk tumbuhan paku. Beberapa kelompok telah melakukan penelitian farmakologis terhadap tumbuhan paku dan tumbuhan terkait sebagai respons terhadap laporan mengenai khasiat terapeutiknya, keingintahuan ilmiah, dan kebutuhan akan obat-obatan baru. Studi farmakologis dan etnofarmakologis terhadap zat-zat dari tumbuhan paku telah mengungkapkan berbagai efek farmakologis, termasuk sitotoksitas, aktivitas hepatoprotektif, aktivitas anti-inflamasi, dan sifat antimikroba. Karena adanya kebutuhan akan

obat-obatan baru dengan aktivitas tersebut, pteridofita dan metabolit sekundernya mungkin memiliki nilai medis yang cukup besar.

*Stenochlaena palustris* (Burm.) Bedd., sebuah tumbuhan paku yang termasuk dalam keluarga Blechnaceae, dapat ditemukan merambat tinggi di pepohonan atau menjalar di atas tanah. Tumbuhan ini asli dari berbagai daerah tropis, termasuk India selatan dan utara, Malaysia, Polinesia, dan Australia. Spesies ini termasuk dalam keluarga Blechnaceae, yang memiliki tujuh spesies, termasuk satu yang endemik di Provinsi Riau, *S. riauensis*. Di Malaysia, Thailand, Filipina, dan Indonesia, pucuk muda yang kemerahan dipanen dari alam liar dan dikonsumsi sebagai sayuran

Spesies ini telah digunakan dalam pengobatan tradisional di beberapa negara untuk mengobati berbagai penyakit. Masyarakat di Western Ghats India, misalnya, menggunakan daun dari spesies ini untuk mengobati demam, sakit tenggorokan, dan tukak lambung. Sementara daun dan rimpangnya digunakan sebagai agen pendingin dalam pengobatan luka bakar dan tukak. Di Malaysia, tumbuhan ini dikonsumsi mentah atau dimasak dengan air mendidih untuk pengobatan diare, sedangkan di Sumatra, Indonesia, digunakan sebagai pencahar ringan. Selain itu, pastinya digunakan untuk mengobati tukak, luka, dan kulit yang terinfeksi bakteri di Pulau Sumatra, Indonesia, Pulau Kalimantan, Malaysia, dan Indonesia. Masyarakat di wilayah tengah Papua Nugini menggunakan daun muda *S. palustris* (Burm.f.) Bedd. sebagai alat kontrasepsi dan getah tumbuhan ini dapat membantu dalam pengobatan demam.

Meskipun spesies ini dapat dimakan dan memiliki sifat obat, beberapa studi farmakologi dan fitokimia telah dipublikasikan. Menurut Chai *et al.*, ekstrak air kasar dari *S. palustris* (Burm.f.) Bedd. memiliki aktivitas antioksidan serta kandungan polifenol, flavonoid, dan asam hidroksinamat yang lebih tinggi. Chai dan rekan-rekannya juga mengungkapkan bahwa ekstrak air dari spesies ini bertindak sebagai penghambat  $\alpha$ -glukosidase yang kuat dibandingkan dengan kuersetin sebagai kontrol. Selanjutnya, ekstrak daun *S. palustris* (Burm.f.) Bedd. menghambat patogen yang ditularkan melalui makanan, *Aspergillus Niger*. Selain itu, ekstrak metanol

dari spesies ini menunjukkan aktivitas penghambatan kolinesterase terhadap asetilkolinesterase dan butirilkolinesterase dengan  $IC_{50}$  masing-masing 121 dan 19,8  $\mu\text{g/mL}$ . Informasi mengenai fitokimia *S. palustris* (Burm.f.) Bedd. masih terbatas. Stenopalusida, serebrosida, lutein, dan  $\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glukopiranosida telah diisolasi dari daun *S. palustris* (Burm.f.) Bedd. Selain itu, stenopalustrosida A-E dan kaempferol glukosida telah diisolasi dari daun spesies ini, dan stenopalustrosida A-D menunjukkan aktivitas antibakteri yang signifikan terhadap strain Gram-positif. Lebih lanjut, kaempferol 3-O-(3"-O-E-p-kumaroil)-(6"-O-E-feruloil)- $\beta$ -D-glukopiranosida dan kaempferol 3-O-(3", 6"di-O-E-p-kumaroil)- $\beta$ -D-glukopiranosida yang diisolasi dari spesies ini menunjukkan sifat sitotoksik terhadap sel kanker payudara (MCF-7 dan MDA-MB231) dan prostat (DU-145).

Dalam penelitian ini, kami melaporkan rincian ekstraksi *S. palustris* (Burm.f.) Bedd. yang menghasilkan sub-ekstrak yang kurang polar, serta evaluasi penangkal radikal bebas. Dalam studi sebelumnya menurut temuan Arullappan *et al.*, etil asetat yang diekstrak dari daun *S. palustris* (Burm.f.) Bedd. menunjukkan aktivitas penghambat radikal DPPH dengan nilai  $IC_{50}$  650  $\mu\text{g/mL}$ . Meskipun metode DPPH umumnya digunakan dalam aktivitas antioksidan, hasilnya tidak terstandarisasi sehingga perbandingan langsung kekuatan antioksidan baik dalam ekstrak tanaman yang berbeda maupun senyawa murni sulit dilakukan. Oleh karena itu, dalam penelitian ini, kami melaporkan indeks aktivitas antioksidan berdasarkan metode Scherer dan Godoy (2009). Analisis ini memungkinkan kami membandingkan kapasitas antioksidan ekstrak dengan kontrol positif. Selain itu, ini adalah pertama kalinya aktivitas penangkal radikal menggunakan radikal oksida nitrat yang berkorelasi dengan inflamasi dilaporkan dari ekstrak spesies ini. Aktivitas antiplasmodium dan antibakteri yang baru dari ekstrak spesies ini juga dilaporkan untuk pertama kalinya. Selain itu, kemotipe molekuler yang sebelumnya dihasilkan dari spesies ini juga dibahas dalam korelasinya dengan klaim farmakologis tanaman.

## **Bahan dan Metode**

### **1. Bahan Tanaman.**

Daun segar *S. palustris* (Burm.f.) Bedd. dikumpulkan di Taman Sains Universitas Riau (0.46587747854712624 dan 101.38066586137639). Sebelum proses penggilingan dimulai, spesies tersebut dikeringkan udara dan dipastikan benar-benar kering, karena beratnya tetap konstan. Sampel tanah kemudian ditempatkan dalam wadah kedap udara dan disimpan antara 2 dan 7°C sampai analisis lebih lanjut. Seorang ahli botani (Dr. Nery Sofanty) telah menyimpan spesimen voucher (No. 37/UN19.5.1.1.3/2019) di Departemen Biologi Universitas Riau.

### **2. Ekstraksi.**

Maserasi dalam metanol hingga 2 kg sampel yang telah digiling selama 1 × 24 jam diulang tiga kali sampai hasil maserasi tidak lagi berwarna hijau tua. Ekstrak disaring selama proses maserasi, dan filtrat dikumpulkan. Maserat kemudian dipekatkan menggunakan rotary evaporator 40°C, menghasilkan ekstrak kasar. Ekstrak metanol kasar kemudian dipartisi menggunakan metode ekstraksi cair-cair. Untuk mendapatkan ekstrak n-heksana, ekstrak metanol dipartisi dengan air dalam rasio 9:1 metanol:air sebelum dipartisi dengan n-heksana dalam rasio 1:4. Ekstrak metanol-air kemudian diencerkan menjadi 40% (v/v) dan dipartisi dengan pelarut diklorometana dalam rasio 1:4 untuk menghasilkan ekstrak diklorometana. Ekstrak metanol-air kemudian diuapkan untuk membentuk ekstrak air, yang kemudian dipartisi dalam rasio 1:3 dengan etil asetat untuk menghasilkan ekstrak etil asetat. Sisa ekstrak air diuapkan untuk menghasilkan produk akhir, yaitu ekstrak air.

### **3. Aktivitas Antioksidan**

Aktivitas Penangkapan Radikal DPPH. Uji aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Berbagai ekstrak dengan konsentrasi akhir 1000 µg/mL diencerkan menggunakan metode pengenceran dua kali lipat (1000–31,25 µg/

mL) dalam microplate polistiren bening 96-sumur. Lima puluh  $\mu\text{L}$  sampel dicampur dengan 80  $\mu\text{L}$  DPPH 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , dan campuran diinkubasi dalam gelap selama 30 menit. Absorbansi diukur pada 520 nm menggunakan pembaca microplate Berthold. Sebagai kontrol positif, asam askorbat diuji dengan metode yang sama. Uji dilakukan tiga kali ulangan, dan data dilaporkan sebagai rata-rata  $\pm$  standar deviasi.

Nilai % Inhibisi dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{Inhibition} = \frac{(A_0 - A_s)}{A_0} \times 100\%.$$

Analisis  $\text{IC}_{50}$  dilakukan menggunakan perangkat lunak GraphPad Prism 9, di mana  $A_0$  adalah absorbansi larutan radikal DPPH tanpa sampel dan  $A_s$  adalah absorbansi sampel dengan larutan radikal DPPH. Uji dilakukan tiga kali ulangan, dan data dilaporkan sebagai rata-rata  $\pm$  standar deviasi. Indeks aktivitas antioksidan (AAI) dihitung sebagai berikut:

$$\text{AAI} = \frac{\text{DPPH}(\mu\text{g}/\text{mL})}{\text{IC}_{50}(\mu\text{g}/\text{mL})}$$

#### 4. Aktivitas Penangkapan Nitrit Oksida.

Aktivitas penangkapan nitrit oksida (NO) dari berbagai ekstrak ditentukan oleh Oskoueian *et al.* Dalam plat dasar datar 96-sumur, enam puluh mikroliter sampel yang telah diencerkan dua kali lipat dicampur dengan enam puluh mikroliter natrium nitroprusida yang dilarutkan dalam bufer fosfat salin (PBS) pada konsentrasi sepuluh milimol per liter. Campuran ini kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 150 menit sambil terpapar cahaya. Pada akhirnya, volume yang sama dari reagen Griess ditambahkan ke setiap sumur untuk mengukur kandungan NO. Asam askorbat digunakan sebagai kontrol positif dalam eksperimen ini. Aktivitas penangkapan NO dihitung menurut rumus:  $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100\%$ , di mana  $A_0$  adalah absorbansi reaksi kontrol dan  $A_1$  adalah absorbansi dengan adanya

sampel. Uji dilakukan tiga kali ulangan, dan data dilaporkan sebagai rata-rata  $\pm$  standar deviasi. Analisis  $IC_{50}$  dilakukan menggunakan perangkat lunak GraphPad Prism 8.

#### **5. Uji Antiplasmodial *in vitro*.**

Dalam analisis ini, digunakan strain *Plasmodium falciparum* yang sensitif klorokuin (3D7) dan resisten klorokuin (W2). Sebanyak 1 mg sampel dilarutkan dalam 100  $\mu$ l DMSO (larutan stok, konsentrasi 10.000  $\mu$ g/ml), dan dilakukan pengenceran berseri dari larutan stok. Parasit yang digunakan dalam tes ini adalah parasit sinkron (tahap cincin) dengan parasitemia kurang dari satu persen. Kemudian, 198  $\mu$ l parasit ditambahkan (konsentrasi akhir bahan uji adalah 100  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml, 0,1  $\mu$ g/ml, dan 0,01  $\mu$ g/ml). Plat ditempatkan dalam ruang inkubasi, dan gas dicampur ( $O_2$  5%,  $CO_2$  5%, dan  $N_2$  90%). Ruang inkubasi berisi plat diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Kultur kemudian dipanen, dan lapisan darah diwarnai dengan Giemsa 20%. Di bawah mikroskop, jumlah eritrosit terinfeksi per 1000 eritrosit sehat ditentukan untuk tes darah yang dilakukan. DMSO digunakan sebagai kontrol negatif dan artemisinin sebagai kontrol positif (obat standar) untuk menghindari hasil palsu. Kemudian, persentase pertumbuhan dan penghambatan ditentukan dengan menganalisis data. Berdasarkan hasil persen penghambatan, analisis statistik menggunakan analisis probit di Minitab®19 dilakukan untuk menentukan nilai  $IC_{50}$  atau konsentrasi bahan uji yang dapat menghambat pertumbuhan parasit hingga 50%. Uji dilakukan tiga kali ulangan, dan data dilaporkan sebagai rata-rata  $\pm$  standar deviasi.

#### **6. Uji Toksisitas.**

Uji letalitas udang air asin (BSLT) digunakan untuk menentukan tingkat toksisitas yang ditunjukkan oleh ekstrak. Setelah menyiapkan sepuluh vial, masing-masing berisi 2 mL air laut, untuk tujuan melakukan metode uji, dilakukan pengenceran dua kali lipat untuk menghasilkan beberapa konsentrasi berbeda. Setelah menerapkan aliquot (0,1 mL) yang mengandung sekitar sepuluh nauplii ke setiap

vial, setup dibiarkan berlanjut selama dua puluh empat jam. Setelah dua puluh empat jam, isi setiap botol diperiksa, dan larva yang mati dihitung. Sebagai bentuk kontrol negatif, dimetil sulfoksida, atau DMSO, digunakan. Uji dilakukan tiga kali ulangan, dan data dilaporkan sebagai rata-rata  $\pm$  standar deviasi. Dengan memplot persentase kematian median terhadap log konsentrasi, kami dapat menentukan konsentrasi ( $LC_{50}$ ) yang mengakibatkan lima puluh persen populasi mati sebagai akibat langsung dari paparan ekstrak.

## 7. Aktivitas Antibakteri

- a. Strain Mikroba. Tujuh mikroorganisme, yaitu, *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *B. subtilis* (ATCC 19659), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Salmonella typhimurium* (ATCC 142028), dan *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802) digunakan dalam penelitian ini. Isolat mikroba dipelihara pada agar miring pada suhu empat °C di Laboratorium Biokimia, Departemen Kimia, Universitas Riau. Sebelum uji antimikroba apa pun, strain disubkultur selama 24 jam pada plat agar segar.
- b. Aktivitas Antibakteri. Selanjutnya, 100  $\mu$ L nutrient broth yang mengandung bakteri patogen diinokulasikan dalam agar nutrisi. Ekstrak diskriming untuk aktivitas antibakterinya terhadap bakteri patogen tersebut dengan menggunakan metode difusi cakram agar dengan suspensi sel sekitar  $1,5 \times 10^6$  CFU/ml yang diperoleh dari standar kekeruhan McFarland No 0,5. Cakram kertas saring steril 6 mm segera ditempatkan ke dalam media yang diinokulasi, dan setiap cakram diisi dengan 20  $\mu$ L ekstrak dengan konsentrasi akhir 500  $\mu$ g/cakram dengan kloramfenikol (30  $\mu$ g/cakram) sebagai kontrol positif, diinkubasi semalam pada 37°C. Setelah 24 jam inkubasi, zona hambat (dalam mm) diukur. Diameter (dalam milimeter) zona hambat di sekitar sumur diukur menggunakan kaliper. Semua prosedur dilakukan

tiga kali ulangan. Minitab®19 digunakan untuk menganalisis perbandingan rata-rata, dan data disajikan sebagai rata-rata  $\pm$  SD.

#### **8. Analisis Statistik.**

Semua tes dilakukan tiga kali ulangan dan hasil yang diperoleh dinyatakan sebagai rata-rata  $\pm$  SD. Data dianalisis menggunakan GraphPad Prism Versi 9, dan perbandingan rata-rata ditentukan oleh analisis varians satu arah (one-way ANOVA) diikuti oleh uji Tukey. Nilai-nilai dianggap berbeda secara signifikan jika berada di bawah tingkat signifikansi (0,05).

### **Hasil**

#### **1. Aktivitas Penangkapan Radikal**

Aktivitas penangkapan radikal bebas dalam penelitian ini ditentukan dengan menggunakan dua uji kimia, yaitu radikal DPPH dan nitrit oksida. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antara ekstrak-ekstrak tersebut, dan ekstrak etil asetat menunjukkan penghambatan tertinggi terhadap radikal DPPH dengan nilai persentase penghambatan  $96,87\% \pm 0,67$ , diikuti oleh diklorometana sebesar  $95,21\% \pm 0,37$  pada konsentrasi  $1000 \mu\text{g}/\text{m}$ , sementara ekstrak n-heksana memiliki penghambatan terendah sebesar  $62,21\% \pm 1,09$ .

Selain itu, konsentrasi penghambatan setengah maksimal ( $\text{IC}_{50}$ ) ekstrak-ekstrak tersebut, bersama dengan asam askorbat yang berfungsi sebagai kontrol positif, dievaluasi di GraphPad Prism 9 menggunakan kurva dosis-respons (Tabel 1). Temuan menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat memiliki  $\text{IC}_{50}$  terendah di antara ekstrak-ekstrak tersebut, dengan nilai  $51,63 \pm 0,46 \mu\text{g}/\text{mL}$ . Meskipun demikian, temuan menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat masih secara signifikan kurang potent dibandingkan asam askorbat, yang memiliki  $\text{IC}_{50}$   $4,15 \pm 0,24 \mu\text{g}/\text{mL}$ .

Selain itu, indeks aktivitas antioksidan ekstrak-ekstrak tersebut menunjukkan rentang aktivitas yang luas. Menurut Tabel 1, ekstrak

diklorometana dan etil asetat memiliki indeks aktivitas antioksidan tertinggi, sedangkan ekstrak n-heksana memiliki indeks terendah. Meskipun etil asetat dan diklorometana memiliki indeks tertinggi, aktivitas kedua senyawa ini dianggap lebih rendah dibandingkan asam askorbat.

Selain itu, aktivitas penangkapan radikal dari ekstrak-ekstrak tersebut diperiksa terkait radikal nitrit oksida (NO), dan hasilnya menunjukkan bahwa ekstrak-ekstrak tersebut menghambat radikal NO dengan cara yang bergantung pada dosis. Terlebih lagi, diklorometana dan etil asetat menunjukkan tingkat aktivitas yang tinggi di antara ekstrak-ekstrak tersebut, dengan persentase penghambatan masing-masing sebesar  $83,40 \pm 0,45\%$  dan  $85,17 \pm 0,58\%$ .

Selanjutnya, nilai  $IC_{50}$  dari ekstrak-ekstrak tersebut dianalisis dengan cara yang sama seperti  $IC_{50}$  untuk uji DPPH. Ekstrak etil asetat menunjukkan aktivitas tinggi dengan  $IC_{50}$   $60,30 \pm 0,65 \mu\text{g}/\text{mL}$ , di mana n-heksana memiliki aktivitas terendah ( $956,70 \pm 0,54 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), dan dibandingkan dengan asam askorbat, ekstrak-ekstrak tersebut menunjukkan aktivitas yang rendah terhadap radikal NO.

## 2. Uji Antiplasmodial *in vitro* dan Toksisitas

Aktivitas antiplasmodial terhadap strain *P. falciparum* 3D7 yang sensitif klorokuin dan W2 yang resisten klorokuin dievaluasi secara *in vitro*, begitu juga dengan toksisitas menggunakan uji letalitas udang air asin. Masing-masing dari empat ekstrak menunjukkan aktivitas terhadap *P. falciparum* dengan cara yang bergantung pada dosis dan pada  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ; etil asetat menghambat pertumbuhan *P. falciparum* sebesar  $69,85 \pm 0,22\%$ , sementara ekstrak diklorometana menunjukkan tingkat aktivitas yang sebanding pada  $64,18 \pm 0,22\%$ . Tingkat aktivitas yang diamati dengan etil asetat sekitar dua kali lebih tinggi dibandingkan diklorometana dengan  $IC_{50}$  masing-masing  $11,06 \pm 0,45$  dan  $21,68 \pm 0,56 \mu\text{g}/\text{mL}$ . Namun, hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak-ekstrak tersebut menunjukkan aktivitas yang lebih rendah

dibandingkan artemisinin, dengan nilai  $IC_{50}$   $0,0054 \pm 0,0013 \mu\text{g/mL}$ . Selanjutnya, ekstrak-ekstrak tersebut diuji dengan uji letalitas udang air asin untuk tingkat toksisitasnya, dan temuan menunjukkan bahwa ekstrak-ekstrak tersebut menunjukkan tingkat toksisitas yang serupa (Tabel 2).

### 3. Aktivitas Antibakteri

Efek ekstrak kasar terhadap pertumbuhan tujuh bakteri indikator yang diuji ditunjukkan pada Tabel 3. Ekstrak etil asetat menunjukkan ekstrak terbaik karena menunjukkan penghambatan tertinggi terhadap *B. cereus* ATCC 10876, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *L. monocytogenes* ATCC 7644, dan *S. Typhimurium* ATCC 14028, diikuti oleh ekstrak diklorometana dengan zona bening terbesar terhadap *B. subtilis* ATCC 19659, dan *S. aureus* ATCC 6538. Aktivitas minor ditunjukkan oleh ekstrak n-heksana, dan tidak ada satu pun dari ekstrak kasar yang mempengaruhi pertumbuhan *E. coli* ATCC 10876.

### Pembahasan

Studi ini menerapkan teknik partisi pelarut-pelarut dengan partisi Kupchan yang dimodifikasi pada ekstrak metanol. Tujuan utama dari partisi Kupchan, sebuah metode praktis dan langsung untuk memulai prosedur pemurnian, adalah memisahkan total ekstrak MeOH menjadi empat ekstrak besar, yang merupakan campuran sederhana dengan polaritas berbeda, hanya menggunakan partisi yang dibuat dari pelarut yang tidak dapat bercampur. Dimungkinkan adanya perbedaan signifikan dalam distribusi antara ekstrak senyawa dengan tingkat polaritas yang berbeda, dan kemudian, ekstrak-ekstrak tersebut diteliti untuk sifat antioksidan, antiplasmodial, dan antibakterinya.

Antioksidan adalah zat yang secara signifikan memperlambat atau mencegah proses oksidasi. Aktivitas antioksidan diukur secara tidak langsung dengan menentukan tingkat penghambatan proses oksidasi dengan adanya antioksidan. Setiap ekstrak kemudian dianalisis aktivitas

antioksidannya menggunakan metode penangkapan radikal bebas (DPPH). DPPH (2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil), suatu radikal organik stabil dalam bentuk kristal dan larutan, sering digunakan untuk mengukur aktivitas antiradikal suatu senyawa atau ekstrak. Kemampuan suatu senyawa atau ekstrak untuk menghilangkan radikal bebas sering dikaitkan dengan kemampuannya bertindak sebagai antioksidan.

Meskipun metode DPPH banyak digunakan, kurangnya standardisasi hasil membuat sulit untuk membandingkan potensi antioksidan dari berbagai ekstrak tanaman dan senyawa murni. Oleh karena itu, Scherer dan Godoy mengusulkan indeks aktivitas antioksidan baru (AAI). AAI dihitung berdasarkan massa DPPH dan massa sampel dalam reaksi, menghasilkan konstanta untuk setiap sampel terlepas dari konsentrasi DPPH dan sampel yang digunakan. Sampel dianggap memiliki tingkat aktivitas antioksidan rendah ketika indeks antioksidan (AAI) kurang dari 0,50. Ketika AAI berada di antara 0,5 dan 1,0, aktivitas antioksidan sampel dianggap sedang. Ketika AAI berada di antara 1,0 dan 2,0, dianggap bahwa sampel memiliki tingkat aktivitas antioksidan tinggi. Menurut standar ini, ekstrak etil asetat dan diklorometana harus dianggap memiliki tingkat aktivitas antioksidan yang tinggi.

**Tabel 1:** Nilai IC<sub>50</sub> dari berbagai ekstrak *S. palustris* (Burm.f.) Bedd. dalam aktivitas penangkapan DPPH dan nitrit oksida

Sampel	DPPH		Nitric oxide IC <sub>50</sub> (µg ML)
	IC <sub>50</sub> (µg ML)	Antioxidant activity index (AAI)	
n-Hexane extract	233.60 ± 0,54	0.34 ± 0.044	956.70 ± 0.54
Dichloromethane	58.33 ± 0.24	1.37 ± 0.065	83.44 ± 0.22
Ethyl acetate extract	51.63 ± 0.46	1.55 ± 0.034	60.30 ± 0.65
Water extract	141.20 ± 0.75	0.57 ± 0.023	412.60 ± 0.47
Ascorbic acid	4.15 ± 0.24	19.28 ± 0.045	54.8 ± 0.76

Aktivitas penangkapan radikal dari ekstrak-ekstrak ini mungkin disebabkan oleh keberadaan metabolit sekunder, khususnya senyawa fenolik dan flavonoid. Flavonoid mungkin memiliki beberapa sifat untuk menghilangkan spesies oksigen dan nitrogen reaktif. Umumnya,

keberadaan hidrosilasi orto pada cincin-B dari molekul flavonoid, jumlah gugus hidroksil bebas, ikatan rangkap C2-C3 pada cincin-C, atau keberadaan gugus 3-hidroksil tercatat sebagai syarat aktivitas antioksidan dan antiradikal. Menurut temuan dari penelitian sebelumnya, *S. palustris* (Burm.f.) Bedd. mengandung glikosida kaempferol terasilasi dan non-asilasi, yang masing-masing memiliki aktivitas penangkapan radikal bebas terhadap radikal DPPH pada konsentrasi  $IC_{50}$  berkisar antara 120 hingga 400  $\mu$ M.

Berdasarkan temuan ini, dapat disimpulkan bahwa ekstrak *S. palustris* (Burm.f.) Bedd., lebih khususnya diklorometana dan etil asetat, dapat menghambat radikal bebas. Temuan ini konsisten dengan beberapa publikasi lain yang telah dilakukan sebelumnya. Menurut temuan Arullappan *et al.*, etil asetat yang diekstrak dari daun *S. palustris* (Burm.f.) Bedd. yang berasal dari Malaysia, menunjukkan aktivitas penghambatan radikal DPPH dengan nilai  $IC_{50}$  650  $\mu$ g/mL. Selain itu, ekstrak etil asetat *S. palustris* (Burm.f.) Bedd. dari Perak, Malaysia, menunjukkan tingkat aktivitas penangkapan radikal yang tinggi, dan konsentrasi  $IC_{50}$ -nya ditemukan sebesar 49,8  $\mu$ g/mL, yang sebanding dengan hasil yang ditemukan dalam laporan.

Selanjutnya, untuk mengeksplorasi potensi berbagai ekstrak terhadap radikal bebas, penghambat nitrit oksida (NO) ditentukan. Nitrit oksida, juga dikenal sebagai NO, adalah mediator pleiotropik kuat yang diproduksi dari asam amino L-arginin oleh sel endotel vaskular, fagosit, dan sel otak tertentu. Ketika NO bergabung dengan radikal superoksida, anion peroksinitrit yang sangat reaktif yang dikenal sebagai ONOO<sup>-</sup> dihasilkan. Ini adalah saat toksisitas NO menjadi lebih buruk. Reaksi antara nitrit oksida yang dihasilkan oleh sodium nitroprusida dan oksigen menghasilkan pembentukan nitrit. Ion nitrit diazotisasi dengan asam sulfanilat dan berpasangan dengan naftil etilendiamin, membentuk warna merah muda dengan panjang gelombang 546 nm.

Tabel 1 menunjukkan nilai  $IC_{50}$  yang sesuai untuk aktivitas penangkapan NO, dan ekstrak diklorometana dan etil asetat memiliki

nilai  $IC_{50}$  kurang dari 200  $\mu\text{g/ml}$ , menunjukkan aktivitas penangkapan NO yang baik, sedangkan ekstrak n-heksana dan air memiliki nilai  $IC_{50}$  lebih besar dari 400  $\mu\text{g/ml}$ , menunjukkan aktivitas penangkapan NO yang buruk. Nilai penangkapan NO diklasifikasikan berdasarkan Tsai *et al.*

Selain itu, aktivitas penangkapan radikal bebas dari ekstrak *S. palustris* (*Burm.f.*) Bedd., khususnya diklorometana dan etil asetat terhadap radikal nitrit oksida (NO), menunjukkan aktivitas yang sesuai. Hal ini disebabkan oleh keberadaan glikosida kaempferol dalam spesies tersebut. Multiforins A, suatu glikosida kaempferol yang diisolasi dari pakis *Neocheiropteris palmatopedata* menunjukkan persentase penghambatan NO 52% pada 20  $\mu\text{g/ml}$ , dan kaempferol juga dilaporkan menghambat produksi NO dalam lini sel RAW 264.7 pada  $IC_{50}$  90,3  $\mu\text{M}$ .

Stres oksidatif diyakini berperan dalam perkembangan beberapa penyakit, termasuk kanker, diabetes, dan penyakit ginjal. Stres ini disebabkan oleh produksi berlebihan nitrit oksida (NO), yang dapat terjadi akibat infeksi atau peradangan. Akibatnya, menghilangkan radikal NO atau menghambat produksi NO oleh sel yang diaktifkan mitogen dapat menjadi indikator yang menjanjikan untuk menemukan pengobatan baru untuk penyakit-penyakit tersebut. Konsekuensinya, sebagai hasil dari penelitian ini, ekstrak dari spesies ini dapat diteliti lebih lanjut potensi penghambatannya dalam lini sel studi hewan. Keberadaan penghambat NO yang berasal dari spesies ini belum pernah didokumentasikan sebelumnya. Sebagai konsekuensi dari temuan ini, informasi tambahan mengenai aktivitas penangkapan radikal bebas dari spesies ini disediakan.

Selain itu, ditemukan bahwa keempat ekstrak memiliki berbagai tingkat aktivitas terhadap strain *P. falciparum* 3D7 yang sensitif klorokuin dan strain W2 yang resisten klorokuin (Tabel 2). Menurut pedoman WHO dan persyaratan dasar penemuan obat antiparasit, aktivitas ekstrak dibagi menjadi empat kategori berdasarkan nilai konsentrasi  $IC_{50}$  mereka: aktivitas tinggi ( $IC_{50} \leq 5 \mu\text{g/ml}$ ), aktivitas menjanjikan ( $5 \mu\text{g/ml} < IC_{50} \leq 15 \mu\text{g/ml}$ ), aktivitas sedang ( $15 \mu\text{g/ml} < IC_{50} \leq 50 \mu\text{g/ml}$ ), dan aktivitas rendah ( $IC_{50} > 50 \mu\text{g/ml}$ ).

Oleh karena itu, ekstrak diklorometana dan etil asetat masing-masing memiliki aktivitas antiplasmodial sedang dan menjanjikan, sedangkan ekstrak n-heksana dan air diklasifikasikan memiliki aktivitas rendah. Hal ini mungkin disebabkan oleh keberadaan glukosida kaempferol, seperti kaempferol 3-O- $\alpha$ -L rhamnopyranoside, yang diisolasi dari daun *S. palustris* (*Burm.f.*) Bedd. Senyawa ini telah dilaporkan memiliki aktivitas antiplasmodial yang menjanjikan terhadap *P. falciparum* yang resisten klorokuin dengan IC<sub>50</sub> 106  $\mu$ M. Temuan ini didukung oleh laporan sebelumnya yang menentukan aktivitas antimalaria dari ekstrak etanol daun *S. palustris* (*Burm.f.*) Bedd. terhadap parasitemia dan splenomegali *Plasmodium berghei* ANKA pada mencit BALB/c yang terinfeksi. Hasil menunjukkan bahwa ekstrak memiliki aktivitas antimalaria yang baik pada nilai ED50 77,05 mg/kg berat badan.

**Tabel 2:** Aktivitas antiplasmodial dan toksisitas ekstrak *S. palustris* (*Burm.f.*) Bedd.

Sampel	Antiplasmodial (IC <sub>50</sub> ; $\mu$ g/mL)	Toxicity (LC <sub>50</sub> ; $\mu$ g/mL)
<i>n</i> - Hexane extract	>100	>1000
Dichloromethane extract	21.68 $\pm$ 0.56	>1000
Ethyl acetate extract	11.06 $\pm$ 0.43	>1000
Water extract	62.19 $\pm$ 0.34	>1000
Artemisinin (control)	0.0054 $\pm$ 0.0013	—

**Tabel 3:** Aktivitas antibakteri ekstrak *S. palustris* (*Burm.f.*) Bedd. pada konsentrasi 500  $\mu$ g/disk terhadap bakteri Gram-negatif dan Gram-positif.

Microorganisms	Inhibition zone (cm)				
	<i>n</i> - Hexane	Dichloromethane	Ethyl acetate	Water extract	Chloramphenicol
<i>Bacillus subtilis</i>	0.00 $\pm$ 0 <sup>c</sup>	<b>1.30 <math>\pm</math> 0.03<sup>b</sup></b>	1.11 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.73 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	3.18 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
<i>Bacillus cereus</i>	0.00 $\pm$ 0 <sup>d</sup>	0.85 $\pm$ 0.02 <sup>bc</sup>	<b>0.90 <math>\pm</math> 0.01<sup>b</sup></b>	0.73 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	2.57 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
<i>Streptococcus aureus</i>	0.75 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	<b>0.93 <math>\pm</math> 0.03<sup>b</sup></b>	0.85 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.73 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	2.91 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.00 $\pm$ 0 <sup>d</sup>	0.86 $\pm$ 0 <sup>c</sup>	<b>0.93 <math>\pm</math> 0<sup>b</sup></b>	0.82 $\pm$ 0 <sup>c</sup>	2.15 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.00 $\pm$ 0 <sup>c</sup>	0.00 $\pm$ 0 <sup>c</sup>	<b>0.84 <math>\pm</math> 0.03<sup>b</sup></b>	0.00 $\pm$ 0 <sup>c</sup>	2.51 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
<i>Salmonella typhi</i>	0.00 $\pm$ 0 <sup>c</sup>	0.82 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	<b>0.83 <math>\pm</math> 0.02<sup>b</sup></b>	0.77 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	2.67 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
<i>Escherichia coli</i>	0.00 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	0.00 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	0.00 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	0.00 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	2.95 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>

<sup>a-e</sup> mengindikasikan bahwa nilai dalam baris yang sama dengan huruf kecil yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan (p

< 0.05). Cetak tebal: menunjukkan penghambatan tertinggi pada setiap mikroorganisme indikator.

Ekstrak-ekstrak tersebut diuji toksisitasnya menggunakan uji letalitas udang air asin (brine shrimp) untuk menentukan tingkat toksisitas keseluruhannya. Uji ini adalah metode sederhana dan sangat efektif untuk menentukan potensi toksik dari zat atau ekstrak bioaktif. Uji ini didasarkan pada kemampuan senyawa uji untuk membunuh udang, organisme zoologi yang relatif sederhana (*Artemia Salina*). Menurut Meyer dan rekan, ekstrak tanaman menunjukkan toksisitas dengan nilai  $LC_{50}$  kurang dari 1000  $\mu\text{g/ml}$ ; namun, ekstrak tanaman dianggap sangat toksik untuk udang dengan nilai  $LC_{50}$  kurang dari 30  $\mu\text{g/ml}$ . Hasil penelitian menunjukkan nilai  $LC_{50}$  tidak toksik >1000  $\mu\text{g/ml}$  untuk semua ekstrak (Tabel 2).

Hasil ini bertentangan dengan laporan sebelumnya, yang menyebutkan bahwa ekstrak etanol *S. palustris* (Burm.f.) Bedd. yang tumbuh di Bangladesh menunjukkan  $LC_{50}$  pada 184,7  $\mu\text{g/ml}$  menggunakan metode BSLT. Toksisitas udang air asin telah ditemukan dapat memprediksi sitotoksitas dan aktivitas parasit. Ada korelasi kuat antara toksisitas BSLT dan sitotoksitas terhadap lini sel 9 KB (karsinoma nasofaring manusia) dan tumor lainnya serta leukemia murine *in vivo*. BSLT mendeteksi aktivitas antikanker yang kuat, tetapi kemampuan prediktifnya untuk membedakan antara senyawa antikanker kuat, sedang, dan lemah terbatas. Dengan demikian, BSLT memberikan penapisan cepat untuk sitotoksin kuat dan tingkat diskriminasi kanker yang lebih tinggi.

Secara umum, sebagian besar ekstrak yang diuji menunjukkan aktivitas antibakteri yang lemah. Seperti ditunjukkan pada Tabel 3, ekstrak pada 500  $\mu\text{g/disk}$  menunjukkan aktivitas penghambatan yang bervariasi terhadap semua bakteri, dengan diameter zona penghambatan berkisar antara 0,7 hingga 1,5 cm. Respon mikroorganisme terhadap ekstrak yang berbeda bervariasi. Dalam penelitian ini, ditentukan bahwa semua ekstrak menghambat bakteri Gram-positif lebih efektif daripada bakteri Gram-negatif. Seperti yang didukung oleh hasil ini, mikroorganisme

Gram-negatif biasanya lebih resisten terhadap agen antimikroba daripada bakteri Gram-positif. Hal ini telah lama dikaitkan dengan penghalang permeabilitas membran luar pada bakteri Gram-negatif, yang mencegah agen antimikroba mencapai targetnya dalam sel bakteri.

Meskipun aktivitas antibakteri dari ekstrak menunjukkan antibakteri yang lemah, perlu dicatat bahwa temuan dari Liu *et al.* menunjukkan bahwa stenopalustrosides A-D menunjukkan aktivitas antibakteri yang signifikan terhadap strain Gram-positif (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, dan *Micrococcus luteus*) dengan MIC antara 2 dan 64 µg/mL. Laporan lain menunjukkan bahwa ekstrak metanol dari *S. palustris* (Burm.f.) Bedd. menunjukkan berbagai aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen dengan rentang MIC antara 50 dan 12,5 mg/mL.

Spesies ini, secara keseluruhan, menunjukkan berbagai aktivitas biologis sepanjang penelitian ini. Menurut temuan penelitian, spesies ini menunjukkan aktivitas potensial dengan menangkap radikal bebas (DPPH dan nitrit oksida), dan kemampuan untuk menghambat radikal nitrit oksida pada spesies ini dilaporkan untuk pertama kalinya. Selain itu, ini adalah pertama kalinya aktivitas antiplasmodium dari spesies ini dilaporkan, dan memiliki potensi yang baik untuk menghambat pertumbuhan kedua strain plasmodium. Di sisi lain, spesies ini tidak menunjukkan aktivitas antibakteri yang signifikan. Namun, keterbatasan penelitian ini adalah kami tidak melaporkan senyawa fitokimia yang ada dalam spesies ini. Sebaliknya, kami menghubungkan aktivitas biologis yang terungkap dalam penelitian ini dengan senyawa yang sudah diketahui ada dalam spesies berdasarkan penelitian yang telah dipublikasikan sebelumnya.

## **Kesimpulan**

Hasil penelitian ini telah menunjukkan bahwa ekstrak *S. palustris* memiliki aktivitas antioksidan dan antiplasmodial yang menjanjikan. Ekstrak diklorometana dan etil asetat menunjukkan tingkat aktivitas antiplasmodial dan penangkapan radikal yang signifikan. Di sisi lain, aktivitas antibakteri dari ekstrak-ekstrak tersebut hanya menunjukkan

tingkat aktivitas yang lemah terhadap bakteri patogen. Temuan ini memberikan dasar untuk penelitian lebih lanjut dalam mengisolasi dan menganalisis aktivitas biologis metabolit sekunder yang ditemukan dalam ekstrak-ekstrak tersebut.

## B. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Akar Kalakai dari Kalimantan Tengah

---

Penggunaan tumbuh-tumbuhan alami sebagai tanaman obat di Indonesia sedang populer, kebanyakan masyarakat di daerah-daerah mempercayai bahwa penggunaan tumbuhan alami sebagai obat relatif aman karena tidak memiliki efek samping yang berlebih (Sharma *et al.*, 2014). Kalimantan sebagai daerah hujan tropis menyimpan sekurang-kurangnya 4.000 spesies tumbuhan yang dapat menjadi sumber temuan obat baru (Kepmenkes, 2007). Tanaman khas Kalimantan yang banyak digunakan sebagai tanaman obat adalah kalakai atau sering juga disebut paku haruan (*Stenochlaena palustris* Bedd) atau pakis. Kalakai di Filipina disebut sebagai barangbang, dan di Malaysia disebut sebagai pucuk manis.

Penelitian sebelumnya telah menjelaskan bahwa kalakai atau pakis (daun dan batang) mengandung zat besi yang sangat tinggi sehingga baik digunakan pada penderita anemia (Maharani *et al.*, 2013). Liu *et al.* (1999) menyebutkan bahwa terdapat 5 (lima) glikosida flavonol baru dalam daun *Stenochlaena palustris*, dimana satu sampai empat dari kandungan tersebut secara signifikan menunjukkan aktivitas antibakteri gram negatif. Selain itu, kalakai atau pakis juga mengandung beberapa senyawa bioaktif seperti fenolik, flavonoid, alkaloid dan keluarga terpenoid (Ho *et al.*, 2010) yang telah terbukti sangat efektif sebagai antioksidan (Dai & Mumper, 2010). Senyawa fenolik seperti antosianin dan beberapa zat besi paling banyak terdapat pada daun muda dari pakis (Chai *et al.*, 2012).

Akar kalakai (*Stenochlaena palustris*) belum banyak diteliti. Data ilmiah yang mendukung efektivitas akar kalakai sebagai antioksidan belum banyak dilakukan sehingga minim informasi pada publikasi ilmiah yang hal tersebut pada bagian akar kalakai. Kalakai merupakan

tumbuhan yang tumbuh subur di tanah gambut dan juga ditemukan tumbuh baik di tanah berpasir. Secara karakteristik sifat fisik dan sifat kimianya, terdapat perbedaan yang signifikan antara tanah gambut dan tanah berpasir. Tanah gambut merupakan tanah dengan kandungan organik  $\geq 50\%$  (Mankinen dan Gelfer, 1982) bahkan  $\geq 75\%$  (ASTM, 1985). Penelitian ini bertujuan mengetahui aktivitas antioksidan dari akar kalakai (*Stenochlaena palustris*) yang tumbuh pada tanah gambut dan tanah berpasir berdasarkan parameter Inhibitory Concentration 50 ( $IC_{50}$ ) dengan metode 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

### **Metode Penelitian**

#### **1. Bahan**

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini adalah akar kalakai. Bahan baku tumbuhan ini diambil dari dua lokasi dengan jenis tanah yang berbeda yaitu tanah gambut terletak di Jl. Dolin Kandang (Mahir Mahar) Palangkaraya dan tanah berpasir di Jl. Cilik Riwut KM 22 Palangkaraya.

#### **2. Pengumpulan dan Pengolahan Simplisia**

Proses penyiapan simplisia dilakukan dengan melakukan sortasi basah, pencucian dengan air bersih, penirisan, perajangan. Proses pengeringan dilakukan dengan mengeringkan di tempat yang teduh (kering-angin). Kemudian dilakukan sortasi kering, selanjutnya simplisia kering tersebut dibuat dalam bentuk serbuk. Serbuk diayak dengan pengayak nomor 14.

#### **3. Pembuatan Ekstrak**

Serbuk ditimbang sebanyak 100 gram kemudian diekstraksi menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:10 selama 3x24 dengan pergantian pelarut setiap 24 jam. Ekstrak cair kemudian dipisahkan dari residu menggunakan kertas saring. Dilakukan remaserasi sebanyak 2 kali. Ekstrak cair yang diperoleh dipekatkan menggunakan rotary evaporator, kemudian diuapkan di atas waterbath hingga terbentuk ekstrak kental (Jamshidi *et al.*, 2014).

4. Pembuatan larutan kuersetin sebagai pembanding  
Larutan kuersetin dibuat seri kadar dengan konsentrasi berbeda yaitu 1; 2; 3; 4; 5; dan 6 ppm. Larutan sebanyak 0,5 mL DPPH 0,4 mM ditambahkan dengan masing-masing larutan standar kuersetin sebanyak 2 ml, kemudian didiamkan di tempat gelap selama operating time. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang maksimum.
5. Pengujian aktivitas antioksidan  
Larutan sampel dibuat dengan variasi konsentrasi 10, 20, 40, 60, 80 ppm. Sebanyak 0,5 ml larutan DPPH 0,4 mM ditambahkan pada setiap larutan sampel sebanyak 2 mL kemudian larutan didiamkan ditempat gelap selama operating time dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum.
6. Analisis Data  
Nilai  $IC_{50}$  merupakan konsentrasi sampel yang dapat menghambat radikal 74 Volume 05, Nomor 01 (2018) Jurnal Pharmascience bebas sebesar 50% diperoleh dengan memakai persamaan regresi linear  $y = bx + a$ . Data hasil absorbansi masing-masing sampel digunakan untuk mencari % inhibisinya.

**Tabel 1.** Aktivitas Antioksidan Berdasarkan Nilai  $IC_{50}$   
(Jun *et al.*, 2003).

Aktivitas	Nilai $IC_{50}$
Sangat Aktif	<50 ppm
Kuat	50-100 ppm
Sedang	101-250 ppm
Lemah	250-500 ppm
Tidak Kuat	>500 ppm

### Hasil Dan Pembahasan

Uji aktivitas antioksidan memakai metode peredaman radikal bebas 2,2- difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) dengan menggunakan alat spektrofotometer UVVis. Metode ini memiliki kelebihan karena sederhana, mudah, cepat dan memerlukan sedikit sampel (Hanani *et al.*, 2005). Senyawa DPPH merupakan senyawa radikal bebas yang stabil yang dapat

dijadikan model dalam penentuan aktivitas antioksidan suatu sampel. Antioksidan dapat memberikan elektronnya kepada DPPH, sehingga terjadi perubahan warna dari ungu kehitaman menjadi warna kuning (Vaya & Aviram, 2001). DPPH dapat larut dalam pelarut organik yang memiliki sifat polar diantaranya pelarut metanol dan etanol (Rohman & Riyanto, 2005).

Uji aktivitas antioksidan dibandingkan dengan suatu kontrol positif untuk membandingkan antioksidan yang dimiliki. Kuersetin digunakan sebagai kontrol positif karena terbukti memiliki aktivitas antioksidan. Kuersetin mengandung gugus OH pada posisi 3', 4', 3, 5, dan 7 (Salamah & Widyasari, 2015). Gugus OH mampu menstabilkan radikal bebas melalui mekanisme transfer atom H atau transfer elektron dari gugus tersebut.

Persamaan regresi yang didapat dari hubungan konsentrasi kuersetin dengan persen inhibisi yaitu  $y = 7,633x - 30,256$  dengan koefisien korelasi ( $r$ ) sebesar 0,995. Besarnya nilai  $IC_{50}$  kuersetin yaitu pada konsentrasi 2,6 ppm. Hasil nilai  $IC_{50}$  tersebut menunjukkan kuersetin masuk dalam kategori antioksidan yang sangat aktif (Jun *et al.*, 2003). Semakin kecil nilai  $IC_{50}$ , maka semakin besar aktivitas antioksidan. Hal tersebut disebabkan semakin kecil konsentrasi yang diperlukan sampel dalam menghambat radikal bebas. Hasil ini juga dapat menunjukkan validitas metode dalam pengujian antioksidan karena secara teoritis kuersetin memiliki aktivitas yang kuat dalam melawan radikal bebas.

Aktivitas antioksidan diuji pada sampel menggunakan metode DPPH. Sampel dibuat dalam bentuk seri konsentrasi, selanjutnya ditambahkan DPPH, dilakukan inkubasi selama 30 menit untuk memastikan reaksi terjadi sempurna. Campuran larutan tersebut kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 516 nm. Absorbansi sampel dapat dihitung untuk mendapatkan persen inhibisi.

**Tabel 2.** Hasil  $IC_{50}$  Ekstrak Etanol Akar Kalakai Pada Tanah Gambut dan Pasir

No.	Sampel	$IC_{50}$
1.	Ekstrak etanol akar kalakai pada tanah gambut	19,06 ppm
2.	Ekstrak etanol akar kalakai pada tanah pasir	24,40 ppm

Hasil perhitungan  $IC_{50}$  untuk ekstrak akar kalakai pada tanah gambut dari persamaan linier  $y = 0,599x + 38,577$  yaitu sebesar 19,06 ppm. Pada ekstrak akar kalakai pada tanah pasir dengan persamaan linear  $y = 0,688x + 33,187$ , didapat  $IC_{50}$  sebesar 24,40 ppm. Hasil  $IC_{50}$  kedua ekstrak tersebut termasuk dalam golongan antioksidan yang sangat aktif (Jun *et al.*, 2003). Terdapat perbedaan aktivitas antioksidan pada akar kalakai yang berbeda kondisi tempat tumbuh. Kemampuan aktivitas antioksidan terbesar terdapat pada akar kalakai yang berasal dari tanah gambut yang ditunjukkan dengan kecilnya nilai  $IC_{50}$ . Semakin kecil nilai  $IC_{50}$ , maka semakin kuat aktivitas antioksidannya. Perbedaan tersebut disebabkan adanya perbedaan tempat tumbuh yang dipengaruhi perbedaan nutrisi yang terdapat pada dua jenis tanah yang berbeda tersebut (Rohaeti *et al.*, 2011). Akar kalakai tumbuh optimum pada daerah yang memiliki kelembaban tinggi seperti lahan gambut (Shinta dan Atyk, 2011). Faktor yang juga dapat berpengaruh yaitu temperatur, tingkat kebasahan tanah, intensitas sinar matahari, dan kadar  $CO_2$  pada daerah sekitar tumbuhan (Neldawati *et al.*, 2013).

### Kesimpulan

Hasil uji aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol akar kalakai yang tumbuh pada tanah pasir dan tanah gambut memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat. Hal tersebut ditandai dengan nilai  $IC_{50}$  pada ekstrak etanol akar kalakai tanah gambut sebesar 19,06 ppm dan ekstrak etanol akar kalakai tanah pasir sebesar 24,40 ppm.

### C. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Kelakai Terhadap *Salmonella typhi* dan *Staphylococcus aureus*

Penyakit infeksi merupakan salah satu masalah kesehatan yang paling utama di negara-negara berkembang termasuk Indonesia. Berdasarkan Survey Kesehatan Rumah Tangga tahun 2007, penyebab utama kematian antara lain 28,1 % disebabkan oleh penyakit infeksi dan parasit. Hal inilah yang mendorong dan mendasari pencarian sumber obat-obatan alami yang murah dan memiliki potensi aktivitas antimikroba. Pemanfaatan tanaman herbal untuk pengobatan tradisional telah menyatu di masyarakat. Hal ini dikarenakan tanaman herbal memiliki beberapa keuntungan, salah satunya yaitu memiliki efek samping yang rendah apabila dibandingkan dengan obat yang terbuat dari bahan sintetik. Selain itu, tanaman herbal juga mudah diproduksi, mudah diperoleh dan murah dibandingkan dengan obat sintetik.

Tanaman kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F) Bedd) sangat dikenal oleh masyarakat Kalimantan Tengah sebagai tanaman obat karena tanaman tersebut mudah didapat dan memiliki banyak manfaat seperti penambah darah, menunda penuaan, antidiare, dan sayuran yang lezat. Daun kelakai dapat digunakan sebagai obat tradisional karena mengandung golongan senyawa flavonoid dan tanin yang diantaranya berfungsi untuk mencegah kekurangan darah (pencegah anemia), menstruasi teratur dan antidiare serta berkhasiat sebagai pereda demam, dan juga mengobati sakit kulit, meningkatkan ASI, dan dapat mengobati kanker. Kandungan kimia yang terdapat pada kelakai antara lain tanin, flavonoid, steroid, alkaloid, lemak, protein, kalsium, mineral Fe, vitamin C, dan vitamin A.

Berdasarkan latar belakang di atas, peneliti tertarik untuk melakukan pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F) Bedd) terhadap *Salmonella thypi* dan *Staphylococcus aureus* dengan metode difusi agar.

## Metode Penelitian

1. Pengambilan Sampel Tanaman dan Determinasi  
Sampel daun kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm. F) Bedd) diperoleh dari Kota Palangkaraya, Kalimantan Tengah. Determinasi dilakukan di Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati ITB Bandung. Hasil determinasi menunjukkan bahwa bahan penelitian termasuk *Stenochlaena palustris* (Burm. F) Bedd. Pengolahan bahan meliputi sortasi basah, pencucian, pengeringan, sortasi kering, penyimpanan, dan penggilingan hingga diperoleh simplisia dalam bentuk serbuk.
2. Karakterisasi Simplisia dan Penapisan Fitokimia  
Pemeriksaan karakterisasi simplisia meliputi, pemeriksaan makroskopik, pemeriksaan mikroskopik, penetapan kadar air, penetapan kadar abu total, penetapan kadar abu larut air, penetapan kadar abu tidak larut asam, penetapan kadar sari larut air, penetapan kadar sari larut etanol, dan penetapan susut pengeringan. Penapisan fitokimia dilakukan untuk pemeriksaan senyawa golongan alkaloid, flavonoid, saponin, kuinon, tanin dan steroid.
3. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kelakai  
Sebanyak 100 g serbuk simplisia ditimbang dan ditambahkan dengan 1 L etanol 96%, kemudian dimaserasi selama 3 kali 24 jam. Ekstrak disaring dengan kain flanel, selanjutnya dengan kertas saring. Kemudian ekstrak dipekatkan dengan menggunakan evaporator agar diperoleh ekstrak kental dengan bobot tetap.
4. Pembuatan Bakteri Uji  
Sebanyak 3,8 gram serbuk agar dilarutkan dalam air suling steril sebanyak 100 mL aquadest, kemudian dipanaskan hingga larut dalam labu erlenmeyer, lalu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit dengan pH 7,2-7,4 dengan ketebalan media 3-4 mm pada saat pembuatan media di cawan petri. Pembuatan biakan miring yaitu dengan menggoreskan biakan dari stok bakteri ke media Mueller Hinton Agar (MHA) miring yang masih baru. Diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Dari biakan tersebut diambil satu ose

untuk setiap bakteri uji dan dilarutkan dalam Mueller Hinton Broth (MHB), diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Suspensi yang telah diinkubasi kemudian dikocok menggunakan pengocok vortex sehingga diperoleh absorban dengan rentang 0,08–0,10 pada 625 nm yang diukur dengan spektrofotometer.

5. Pembuatan inokulum standar

Dalam membuat stok bakteri ini digunakan inokulum standar yaitu stok bakteri 108 CFU/mL sama dengan standar 0,5 McFarland. Diambil 0,5 mL dari larutan BaCl<sub>2</sub> dengan konsentrasi 0,048 mol/L, yang di tambahkan 99,5 mL larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dengan konsentrasi 0,18 mol/L (0,36 N) (1% v/v). Diukur dengan spektrofotometri Uv-Visibel, panjang gelombang 625 nm dan rentang absorban antara 0,08-0,10. Koloni diinkubasi selama 1 kali 24 jam sampai terbentuk koloni. Kemudian ambil kurang lebih 3-5 koloni dengan kawat ose, masukan ke dalam 4-5 mL MHB. Inkubasi pada suhu 37 °C selama 2-6 jam. Setiap satu jam sekali diambil dan dicek dalam spektrofotometri sampai menghasilkan absorban yang konstan atau sama dengan nilai absorban inokulum standar.

6. Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas daya hambat ekstrak etanol daun kelakai dilakukan pada konsentrasi 12.5 %, 25 %, 37.5 %, 50 % dan 100 %. Sebanyak 10 µL suspensi bakteri *S. typhi* dan 10 µL suspensi bakteri *S. aureus* ditambahkan ke dalam 20 mL media Mueller-Hinton Agar (MHA) di dalam cawan petri steril. Campuran kemudian dihomogenkan lalu didinginkan dan dibiarkan memadat. Kertas cakram yang mengandung ekstrak etanol daun kelakai ditempelkan pada media yang sudah memadat. Diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam, diameter hambat diamati setelah periode inkubasi dan dilakukan 3 kali replikasi.

7. Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM)

Ekstrak yang diperoleh diuji Konsentrasi Hambat Minimumnya terhadap bakteri *S. thypi* dan *S. aureus*. Ekstrak dicampur pada media MHA, didinginkan dan dibiarkan memadat. Selanjutnya media yang telah memadat digoreskan dengan bakteri menggunakan cottonbud steril yang diambil dari suspensi bakteri. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama selama 24 jam untuk pengamatan konsentrasi hambat minimum daun kelakai. Kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Diamati zona bening, apabila terdapat zona bening maka diinkubasi kembali selama 24 jam dan dimati kembali zona bening pada petri tersebut apabila tidak ditumbuhi bakteri maka zona bening tersebut merupakan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM).

8. Penentuan Kesetaraan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kelakai terhadap Antibakteri Pembanding

Penentuan kesetaraan aktivitas ekstrak etanol daun kelakai terhadap antibakteri pembanding dilakukan dengan metode difusi agar dengan menggunakan paperdisk. Antibakteri yang digunakan adalah Tetrasiklin. Dari hasil pengukuran diameter hambatan antibakteri, dibuat persamaan garis antara logaritma konsentrasi ( $x$ ) dengan diameter hambatan ( $y$ ). Persamaan yang didapat selanjutnya digunakan untuk melihat kesetaraan antara ekstrak uji dengan antibakteri pembanding. Hasil yang diharapkan adalah diperoleh nilai kesetaraan nilai aktivitas ekstrak uji dengan antibakteri pembanding.

### Hasil dan Pembahasan

Pengolahan daun kelakai menjadi simplisia meliputi sortasi basah, pencucian, perajangan, pengeringan, sortasi kering dan kemudian dibuat menjadi serbuk simplisia. Proses pengeringan dilakukan dengan menggunakan sinar matahari secara tidak langsung yang ditutup dengan menggunakan kain berwarna hitam, penggunaan kain berwarna hitam bertujuan agar simplisia tidak langsung terpapar oleh sinar matahari dan mencegah kerusakan kandungan zat aktif yang ada dalam tanaman.

Pengeringan dilakukan untuk mengurangi kadar air dan mencegah tumbuhnya jamur atau bakteri sehingga simplisia yang diperoleh dapat disimpan lebih lama dan tidak mudah rusak serta komposisi kimianya tidak mengalami perubahan, bahan kering yang diperoleh kemudian dihaluskan untuk di dapat serbuk simplisia daun kelakai. Setelah dilakukan pengolahan bahan hingga menjadi serbuk simplisia kering, 100 g serbuk simplisia diekstraksi dengan cara maserasi selama 3 kali 24 jam dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Ekstrak cair yang diperoleh kemudian diuapkan dengan menggunakan penguap vakum putar dan waterbath sehingga dihasilkan ekstrak kental dengan bobot tetap.

Selanjutnya dilakukan penapisan fitokimia yang bertujuan untuk pemeriksaan kandungan kimia secara kualitatif untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam suatu tumbuhan. Hasil positif terdeteksi pada golongan senyawa flavonoid, alkaloid, tannin, dan steroid. Hasil negatif terdeteksi pada golongan senyawa kuinon dan saponin. Daun kelakai mengandung senyawa flavonoid, alkaloid dan steroid merupakan senyawa yang mempunyai efek farmakologi sebagai antibakteri. Flavonoid dengan kemampuannya membentuk kompleks dengan protein dan merusak membran sel dengan cara mendenaturasi ikatan protein pada membran sel, sehingga membran sel menjadi lisis dan senyawa tersebut menembus ke dalam inti sel menyebabkan bakteri tidak berkembang. Sedangkan aktivitas antibakteri dari senyawa tanin adalah dengan cara mengkerutkan dinding sel atau membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel itu sendiri. Akibat terganggunya permeabilitas, sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat atau bahkan mati.

**Tabel 1.** Hasil Penapisan Fitokimia Simplisia Daun Kelakai

No.	Pemeriksaan	Hasil Pengamatan
1.	Alkaloid	+
2.	Flavonoid	+
3.	Saponin	-
4.	Tannin	+

No.	Pemeriksaan	Hasil Pengamatan
5.	Kuinon	-
6.	Steroid/Triterpenoid	+

Aktivitas ekstrak etanol daun kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F) Bedd) dalam menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif *Salmonella thypi* lebih peka bila dibandingkan dengan bakteri Gram positif *Staphylococcus aureus*. Hal ini disebabkan adanya perbedaan struktur dinding sel kedua jenis bakteri tersebut. Dinding sel bakteri Gram positif terdiri atas beberapa lapisan peptidoglikan yang membentuk struktur yang tebal dan kaku serta mengandung substansi dinding sel yang disebut asam teikoat, sedangkan dinding sel bakteri Gram negatif terdiri atas satu atau lebih lapisan peptidoglikan yang tipis dan membran di bagian luar lapisan peptidoglikan, sehingga dinding sel bakteri Gram negatif lebih rentan terhadap guncangan fisik, seperti pemberian antibiotik atau bahan antibakteri lainnya. Selain itu, perbedaan struktur dinding sel inilah yang menyebabkan kedua jenis bakteri tersebut memberikan respon terhadap pewarnaan Gram.

Penghambatan pertumbuhan bakteri disebabkan oleh senyawa kimia yang terkandung pada ekstrak etanol daun kelakai. Daun kelakai mengandung zat aktif berupa alkaloid, flavonoid, dan steroid. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar cakram ekstrak uji. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F) Bedd) memiliki aktivitas antibakteri yang lebih besar terhadap bakteri *Salmonella thypi* dibandingkan bakteri *Staphylococcus aureus*. Hal ini dapat dilihat dari diameter hambat *Staphylococcus aureus* sebesar 17,20 mm sedangkan pada *Salmonella thypi* sebesar 18,16 mm dengan konsentrasi 125.000 µg/mL.

**Tabel 2.**

Buku Uji	Konsentrasi ( $\mu\text{g ML}$ )	Diameter Hambat (mm) <i>S. aureus</i>			Rata-rata	Standar Deviasi (SD)
		Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3		
<i>S. aureus</i>	1000000	28,02	28,85	28,90	28,59	0,49
	500000	26,30	26,48	25,88	26,22	0,30
	375000	23,28	22,50	23,04	22,94	0,39
	250000	20,15	20,00	20,15	20,10	0,08
	125000	18,26	19,05	18,28	18,53	0,45
<i>S. typhi</i>	1000000	29,01	28,78	28,85	28,88	0,11
	500000	26,75	26,30	26,00	26,00	0,37
	375000	23,40	23,55	23,48	23,47	0,07
	250000	22,30	22,70	21,98	22,32	0,36
	125000	15,24	16,05	15,20	15,20	0,47

Penentuan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dilakukan pada rentang konsentrasi 1-14% terhadap bakteri *S. aureus* dimana nilai KHM yang didapatkan sebesar 10,6% dan nilai KBM yang diperoleh sebesar 11% sedangkan pada bakteri *S. typhi* nilai KHM yang diperoleh sebesar 9% dan nilai KBM yang diperoleh sebesar 10,8%. Nilai kesetaraan ekstrak terhadap antibakteri pembanding menunjukkan bahwa 1 mg ekstrak etanol daun kelakai terhadap bakteri *S. aureus* setara dengan 28,21 mg tetrasiklin sedangkan *S. typhi* setara dengan 23,65 mg tetrasiklin.

### Kesimpulan

Nilai KHM Ekstrak daun kelakai terhadap *S. aureus* pada konsentrasi 10,6% Sedangkan *S. typhi* pada konsentrasi 9%. Nilai KBM Ekstrak daun kelakai terhadap *S. aureus* pada konsentrasi 11% Sedangkan *S. typhi* pada konsentrasi 10,8%. Nilai kesetaraan 1 mg tetrasiklin terhadap aktivitas ekstrak etanol daun kelakai untuk *S. aureus* adalah sebesar 28,21 mg ekstrak dan untuk *S. typhi* adalah sebesar 23,65 mg ekstrak.



## Bab 2

### Ekstrak Kelakai untuk Kanker Lidah

#### A. Potensi Kelakai Sebagai Antikanker dalam Perawatan Kanker Mulut

---

Penyakit kanker merupakan salah satu penyakit yang mematikan bagi manusia. Pertumbuhan sel kanker yang tidak normal dan tidak terkendali dapat menyebar ke bagian tubuh lain, berpotensi menyebabkan kematian. Kekhawatiran terhadap kanker semakin besar, mengingat peringkat kanker sebagai penyebab kematian terus meningkat dari tahun ke tahun. Kematian yang disebabkan oleh kanker sangat tinggi jika dibandingkan dengan kematian akibat *Acquired Immunodeficiency Syndrome*, tuberkulosis maupun malaria menurut *World Health Organization* (WHO). Angka kematian akibat kanker hampir mencapai 10 juta jiwa pada tahun 2020. Kanker kepala dan leher merupakan suatu neoplasma ganas yang dapat terjadi di beberapa bagian yaitu pada rongga mulut, telinga, rongga hidung, sinus paranasal, nasofaring, hipofaring, orofaring dan glandula saliva. Dari kelompok kanker kepala dan leher diperkirakan 90% diantaranya merupakan kanker mulut. Sebesar 90% kasus kanker mulut berasal dari jaringan skuamosa, sehingga disebut sebagai karsinoma sel skuamosa

(KSS) rongga mulut, dan menempati urutan kelima dari kasus kanker di seluruh dunia.

Penggunaan obat imunoterapi dalam pengobatan KSS rongga mulut memiliki peran penting dalam mengatasi kondisi immunosupresi. Salah satu jenis imunoterapi yang digunakan adalah obat antibodi monoklonal. Current national comprehensive cancer (CNCC) saat ini merekomendasikan dilakukannya reseksi bedah untuk KSS rongga mulut tahap awal. Radioterapi atau kemoterapi definitif untuk KSS rongga mulut tahap awal menjadi alternatif bagi pasien yang tidak menyetujui tindakan operasi, menolak untuk menjalani operasi, atau menghadapi kondisi penyakit yang recurrent sehingga tidak memungkinkan untuk dilakukan reseksi bedah. Efektivitas bahan alam dalam pencegahan dan pengobatan kanker rongga mulut seperti polifenol, vitamin A, C, dan E, karotenoid, dan ekstrak teh hijau telah dilaporkan. Salah satu tanaman yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai agen kemopreventif adalah *S. palustris*, yang secara umum dikenal sebagai kelakai. *S. palustris* diketahui dapat menginduksi apoptosis pada sel kanker payudara T47D dan indeks selektivitasnya menunjukkan hasil yang positif terhadap sel kanker payudara T47D.<sup>11</sup> Pada uji terhadap kultur lini sel kanker hati HepG-2 diketahui ekstrak *S. palustris* memiliki aktivitas sitotoksik.<sup>1</sup> Efek ekstrak *S. palustris* telah diteliti pada lini sel T47D<sup>11</sup>, MDA-MB-231, dan HepG-21, namun pengaruhnya terhadap sel kanker mulut belum pernah dikaji. Oleh karena itu, penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengeksplorasi efek ekstrak *S. palustris* terhadap kanker mulut.

## Metode

Referensi pada tinjauan ini diidentifikasi melalui PubMed, Google Scholar, dan laporan resmi serta situs web global health organizations dengan istilah pencarian “kanker mulut”, “antikanker”, “*Stenochlaena palustris*”, dan “apoptosis” dari tahun 2013 hingga 2023. Referensi yang di publikasi dalam bahasa Inggris dan bahasa Indonesia dipertimbangkan pada tinjauan ini.

## **Topik Utama**

### **Kanker Mulut: Karsinoma Sel Skuamosa**

Kanker kepala dan leher merupakan suatu neoplasma ganas yang dapat terjadi di beberapa bagian yaitu pada rongga mulut, telinga, rongga hidung, sinus paranasal, nasofaring, hipofaring, orofaring dan glandula saliva. Dari kelompok kanker kepala dan leher diperkirakan 90% diantaranya merupakan kanker mulut. Bibir bawah, dasar mulut, bagian bawah dan tepi lidah, area retromolar, tonsil, dan tepi palatum mole merupakan lokasi umum terjadinya kanker mulut. Sebesar 90% kasus kanker mulut berasal dari jaringan skuamosa, sehingga disebut sebagai KSS rongga mulut,<sup>5</sup> dan menempati urutan kelima dari kasus kanker di seluruh dunia. Lokasi terjadinya KSS pada rongga mulut yaitu di bagian lidah, dasar mulut, alveolar ridge, palatum durum, dan trigonum retromolar. Penyebab meningkatnya insidensi kanker mulut di dunia dalam beberapa tahun terakhir adalah gaya hidup, malnutrisi, perubahan lingkungan, dan faktor genetik. Kebiasaan merokok dan mengunyah sirih merupakan faktor risiko yang umum ditemukan di negara Asia. Beberapa faktor lain yang dapat memicu terjadinya KSS adalah usia, paparan sinar matahari yang berlebihan dan iritasi kronis pada rongga mulut. Penggunaan tembakau merupakan salah satu penyebab kanker yang paling umum pada rongga mulut. Studi epidemiologi, telah melaporkan adanya hubungan positif antara karsinogenesis di rongga mulut dan penggunaan tembakau. Menurut International Agency for Research on Cancer (IARC), alkohol diklasifikasikan sebagai karsinogen kelompok satu. Alkohol memiliki peran sebagai faktor risiko yang independen, namun ketika dikombinasikan dengan tembakau, risiko terjadinya KSS meningkat hingga 35 kali lipat.

KSS pada rongga mulut berasal dari sel epitel mukosa yang melapisi rongga mulut. Secara histologis, KSS rongga mulut memiliki kemampuan untuk berkembang menjadi invasif melalui serangkaian tahap. Progresi KSS pada rongga mulut dimulai dengan paparan karsinogen yang menyebabkan perubahan genetik dan molekuler pada keratinosit oral di seluruh area jaringan yang terpapar, kemudian diikuti oleh displasia epitel

dalam berbagai tingkat dan berakhir dengan transformasi ganas menjadi KSS rongga mulut, yang dapat menyebar ke daerah lain dalam bentuk metastasis. Zat eksogen seperti bahan kimia atau sinyal endogen seperti mediator reaktif yang dihasilkan dari jalur seluler mampu mengakibatkan mutasi pada proto-onkogen dan tumor suppressors gene dapat kehilangan kemampuannya untuk menghambat proliferasi sel kanker.

Current national comprehensive cancer (CNCC) saat ini merekomendasikan dilakukannya reseksi bedah untuk KSS rongga mulut tahap awal. Radioterapi atau kemoterapi definitif untuk KSS rongga mulut tahap awal adalah pilihan bagi pasien yang tidak setuju terhadap operasi, menolak operasi, atau untuk penyakit recurrent yang tidak dapat dilakukan reseksi bedah. Perawatan pada KSS rongga mulut stadium lanjut umumnya dilakukan melalui terapi gabungan. Pendekatan yang dapat dilakukan adalah operasi kemudian dilakukan radioterapi atau kemoterapi tergantung pada kondisi patologis pasien atau pilihan tanpa bedah untuk kasus tertentu. Sistem kekebalan tubuh memiliki peran penting dalam melawan sel kanker, terdiri dari respon imun bawaan dan respon imun adaptif. Oleh karena itu, sistem kekebalan menjadi target dalam penggunaan obat imunoterapi yang berperan dalam mengatasi immunosupresi pada KSS rongga mulut.

Terapi kemoterapi dan radioterapi menimbulkan beberapa efek samping, seperti toksisitas, penurunan fungsi kekebalan tubuh, dan kerusakan pada rongga mulut seperti xerostomia, mucositis, dan osteoradionekrosis. Eliminasi sel kanker yang efektif dengan apoptosis telah menjadi tujuan klinis dari terapi kanker selama lebih dari tiga dekade. Menargetkan jalur apoptosis pada sel tumor memiliki dampak positif karena sel tumor yang mati tidak memiliki peluang untuk berkontribusi pada pembentukan tumor sekunder.

### **Penggunaan Tumbuhan dalam Perawatan Kanker**

Kemoprevensi dalam pengobatan kanker didefinisikan sebagai intervensi farmakologis untuk menghentikan atau menghambat proses karsinogenesis. Agen kemopreventif dikonsumsi dalam jangka waktu

panjang sehingga perlu memenuhi persyaratan tertentu seperti toksisitas rendah, memiliki sedikit atau tidak ada efek samping, mudah dibawa, mudah dikelola, dan hemat biaya. Kemoprevensi merupakan strategi penting untuk menghambat kanker. Dikategorikan menjadi dua yaitu kemoprevensi primer dan sekunder. Pada kanker mulut, kemoprevensi primer dilakukan pada pasien dengan lesi premalignan salah satunya adalah lesi leukoplakia. Kemoprevensi sekunder dilakukan pada pasien yang telah dilakukan perawatan kanker mulut dengan tujuan untuk mencegah metastasis. Kanker mulut menyebabkan morbiditas dan mortalitas yang signifikan. Kemoprevensi dilakukan dengan menggunakan obat-obatan atau bahan alam untuk menghambat berkembangnya lesi premalignan pada rongga mulut dan untuk mencegah terjadinya tumor primer kedua. Seiring dengan kemajuan teknologi, usaha dalam menemukan obat baru yang aman dan selektif terhadap pengobatan dan pencegahan kanker semakin banyak dilakukan. Salah satunya adalah pencarian senyawa kimia alami dengan memanfaatkan bahan alam. Beberapa peneliti melaporkan bahwa senyawa yang terdapat pada tanaman memiliki potensi sebagai agen kemopreventif, yaitu agen yang dapat mengurangi risiko kanker.

### ***Stenochlaena palustris* (Burm.F.) Bedd.**

*S. palustris* merupakan tumbuhan sejenis tanaman paku yang dikenal dengan sebutan kelakai. *S. palustris* merupakan tumbuhan yang sangat mudah ditemukan di Kalimantan dan sangat lazim dikonsumsi oleh masyarakat Dayak sehari-hari. *S. palustris* memiliki distribusi yang luas di daerah tropis, tersebar di Asia Tenggara hingga Australia dan Polinesia. *S. palustris* biasa ditemukan pada lahan basah seperti hutan rawa air tawar, hutan bakau, sungai, dan rawa-rawa.

Masyarakat suku Dayak mempercayai bahwa dengan mengonsumsi *S. palustris* dapat bermanfaat, diantaranya sebagai suplemen penambah darah, obat awet muda, penambah air susu ibu, obat hipertensi, pereda demam dan mengobati sakit kulit seperti gatal dan alergi. *S. palustris* telah dimanfaatkan untuk berbagai pengobatan di Asia Tenggara, misalnya di Semenanjung Malaysia, rebusan dari pucuk muda *S. palustris* diminum

untuk mengobati diare dan demam. Pengobatan demam dengan *S. palustris* juga dapat dilakukan dengan mengoleskan daun *S. palustris* pada kepala orang sakit.

Kandungan fitokimia dari daun *S. palustris* berupa fenetil alkohol, organosilane, terpenoid, asam lemak jenuh, dan flavonoid. Ekstrak *S. palustris* dapat digunakan sebagai antiinflamasi, antimalaria dan antioksidan. Ekstrak *S. palustris* jika dikaitkan dengan aktivitas farmakologisnya dapat berpotensi sebagai afrodisiaka, free radical scavenging, antibakteri, antikanker, dan larvasida. *Stenochlaena palustris* (Burm.F.) Bedd. terhadap Kanker Salah satu tanaman yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai agen kemopreventif adalah *S. palustris*, yang dikenal dalam bahasa sehari-hari sebagai kelakai. Diketahui bahwa aktivitas farmakologis dari *S. palustris* dapat berpotensi sebagai antikanker.

Beberapa penelitian menyatakan bahwa *S. palustris* memiliki aktivitas sitotoksik terhadap lini sel Michigan Cancer Foundation (MCF)-7, Medical Doctor Anderson Mammary Gland Carcinoma (MDA-MB)-231, Duke University (DU)-145, dan Human Hepatocellular Carcinoma (HepG)-2.1 Kandungan metabolit sekunder yang ditemukan pada *S. palustris* seperti flavonoid dan alkaloid diketahui memiliki kemampuan untuk menghambat proliferasi dan menginduksi apoptosis pada berbagai sel kanker. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, senyawa dan aktivitas sitotoksik yang terdapat dalam ekstrak *S. palustris* memiliki potensi dalam menghambat pertumbuhan sel kanker. *S. palustris* belum pernah diteliti pengaruhnya terhadap sel kanker mulut sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh *S. palustris* terhadap kanker mulut.

## **Kesimpulan**

Seiring dengan kemajuan teknologi, Upaya dalam menemukan obat baru yang aman dan selektif dalam pengobatan dan pencegahan kanker semakin banyak dilakukan. Senyawa yang terdapat pada tanaman menunjukkan potensi sebagai agen kemopreventif. Salah satu tanaman

yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai agen kemopreventif adalah *S. palustris*. Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa *S. palustris* dapat berpotensi menjadi antikanker pada beberapa jenis lini sel kanker. Meskipun demikian, belum ada penelitian yang secara khusus dilakukan untuk mengetahui potensi antikanker *S. palustris* terhadap kanker mulut. Penelitian lebih lanjut mengenai potensi *S. palustris* terhadap kanker mulut dapat dilakukan untuk mengetahui kegunaannya dalam bidang terapi kanker.

## B. Penetapan Kadar Flavonoid dalam Ekstrak Daun Kelakai

Kelakai merupakan tumbuhan khas lahan rawa yang tumbuh di Kalimantan Selatan. Kelakai juga merupakan makanan favorit sebagian besar masyarakat Kalimantan. Studi empiris dari daun dan batang kelakai muda digunakan oleh masyarakat suku Dayak sebagai suplemen penambah darah, obat awet muda, penambah ASI pada ibu menyusui, obat tekanan darah tinggi, pereda demam dan mengobati sakit kulit seperti gatal dan alergi (Maharani, dkk., 2005).

Kandungan metabolit sekunder yang terkandung dalam daun kelakai yaitu senyawa alkaloid, steroid dan flavonoid (Anggraeni dan Erwin, 2015). Ekstrak air daun kelakai memiliki kandungan total flavonoid yang tinggi dibandingkan dengan tanaman gerunggang dan pasak bumi yang merupakan tanaman obat Kalimantan Selatan (Suhartono, dkk., 2012). Flavonoid merupakan sekelompok besar senyawa polifenol tanaman yang tersebar luas dalam berbagai bahan makanan dan dalam berbagai konsentrasi. Flavonoid mempunyai sifat yang khas yaitu bau yang sangat tajam, sebagian besar merupakan pigmen warna kuning, dapat larut dalam air dan pelarut organik, mudah terurai pada temperatur tinggi (Rahmat, 2009). Flavonoid diyakini dapat menurunkan aterosklerosis dengan menghambat oksidasi LDL (Low Density Lipoprotein) dengan cara menghambat pembentukan radikal bebas (Silalahi, 2006). Sejauh ini belum pernah dilaporkan penelitian mengenai penetapan kadar flavonoid ekstrak etanol daun kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm. F.) Bedd.)

menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis, sehingga dilakukan penelitian ini.

### **Metode Penelitian**

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian non eksperimental. Penelitian dilakukan di Laboratorium Terpadu I dan Laboratorium Terpadu III Akademi Farmasi Samarinda. Tahapan penelitian meliputi pengumpulan sampel, determinasi sampel, pembuatan simplisia, pembuatan ekstrak etanol daun kelakai, identifikasi golongan senyawa kimia dan penetapan kadar flavonoid dengan spektrofotometri UV-Vis.

### **Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Spektrofotometer UV-1800 (Shimadzu®), rotary evaporator (IKA®), Oven (Mettler®), maserator (IKA®), penangas air, pengaduk elektrik, blender, mikropipet (Vitalab®), timbangan analitik (Ohaus®), ayakan mesh 60, seperangkat alat gelas (pyrex®), corong buchner, rak tabung reaksi, cawan porselen, penjepit tabung, spatel logam dan botol semprot. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk simplisia daun kelakai, etanol 70%, kalium asetat 1 M, aluminium klorida 10%, kuersetin, pereaksi meyer, pereaksi bouchardat, pereaksi dragendorf, FeCl<sub>3</sub> 1%, HCl 2 N, HCl pekat, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, amil alkohol, kloroform, anhidrida asam asetat, serbuk Mg, aluminium foil, air suling dan kertas saring.

### **Prosedur Penelitian Pembuatan ekstrak etanol daun kelakai**

Metode pembuatan ekstrak etanol daun kelakai mengacu pada Depkes RI (2008), dengan modifikasi yaitu serbuk simplisia yang sudah diayak dengan ayakan mesh 60 kemudian ditimbang sebanyak 200 gram, lalu di maserasi dengan etanol 70%, kemudian diaduk menggunakan pengaduk elektrik selama 2 jam. Maserat dan ampas disimpan selama 22 jam dalam wadah tertutup, kemudian disaring menggunakan corong Buchner. Ampas sisa maserasi kemudian diremaserasi lagi dengan etanol 70% dalam toples kaca dengan pengadukan selama 2 jam dan disimpan selama 22 jam, maserat disaring menggunakan corong Buchner. Maserat hasil maserasi

dan remaserasi digabungkan dalam satu wadah dan diuapkan sebagian pelarut menggunakan rotary evaporator kemudian dipekatkan diatas tangas air hingga diperoleh ekstrak kental. Simplisia diremaserasi untuk mendapatkan hasil penyarian yang optimal.

### **Penetapan kadar air ekstrak etanol daun kelakai**

Penetapan kadar air ekstrak etanol daun kelakai menggunakan metode gravimetri. Prinsip metode gravimetri yaitu menghilangkan kadar air dalam sampel dengan pemanasan menggunakan oven pada suhu 105oC agar air yang terikat secara fisik dalam sampel dapat teruapkan sehingga diperoleh berat konstan (Latifah, 2015). Perhitungan kadar air menggunakan rumus sebagai berikut (Dewa dan Mozes, 2014):

$$\text{Kadar air} = \frac{b-(c-a)}{b} \times 100\%$$

Keterangan:

$a$  = berat cawan

$b$  = berat sampel

$c$  = berat cawan + sampel

### **Uji Golongan Senyawa Metabolit Sekunder**

Uji golongan senyawa metabolit sekunder menggunakan larutan ekstrak etanol daun kelakai yang dibuat dengan cara, ekstrak kental ditimbang sebanyak 0,5 gram, lalu dilarutkan dengan etanol sebanyak 10 mL hingga larut sempurna, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan dengan air suling hingga tanda batas (Sapri, dkk., 2014). Larutan tersebut kemudian digunakan untuk melakukan uji senyawa metabolit sekunder, yaitu Uji alkaloid (Pereaksi meyer, Pereaksi bouchardat, Pereaksi dragendorf), uji flavonoid, uji Tannin, uji saponin, uji triterpenoid/steroid (Dewi dkk, 2013; Sapri dkk, 2014).

## Penetapan kadar flavonoid

1. Pembuatan larutan induk (Kuersetin 100 ppm)  
Pembuatan larutan induk dilakukan dengan menimbang kuersetin sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan dengan etanol 70% dalam labu ukur 100 mL. Sehingga diperoleh larutan kuersetin 100 ppm.
2. Pembuatan larutan seri standar kuersetin  
Pembuatan larutan standar dengan cara larutan induk dipipet sebanyak 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1 mL masing-masing ke dalam labu ukur 10 mL menggunakan mikropipet. Volume nya dicukupkan dengan etanol 70% sampai tanda batas, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm.
3. Pembuatan larutan blanko  
Larutan blanko dalam penelitian ini menggunakan etanol 70% sebanyak 4 mL, kalium asetat 0,2 mL dan aluminium klorida 0,2 mL, ditambahkan aquades 5,6 mL, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL.
4. Penentuan panjang gelombang serapan maksimum ( $\lambda$  maks)  
Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan cara larutan standar (4 ppm) dipipet 0,5 mL ke dalam labu ukur 10 mL. Etanol 70% ditambahkan sebanyak 1,5 mL, aluminium klorida 10% sebanyak 0,1 mL, kalium asetat 1 M sebanyak 0,1 mL dan ditambahkan air suling sebanyak 2,8 mL, dikocok sampai homogen. Absorbansinya diukur pada panjang gelombang 350-500 nm.
5. Pembuatan kurva kalibrasi  
Panjang gelombang maksimum diperoleh kemudian dilakukan pembuatan kurva kalibrasi dengan cara larutan standar 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm dipipet sebanyak 0,5 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL kemudian ditambahkan 1,5 mL etanol 70%, 0,1 mL aluminium klorida 10%, 0,1 kalium asetat 1 M dan ditambahkan air suling 2,8 ml, dikocok sampai homogen. Larutan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit kemudian serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.

## 6. Pembuatan larutan ekstrak

Pembuatan larutan sampel ekstrak daun kelakai ditimbang sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan dengan 5 mL etanol 70% dalam gelas kimia 100 mL. Larutan diaduk menggunakan batang pengaduk, setelah itu dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Gelas kimia dibilas dengan etanol 70% kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1000 ppm. Setelah diperoleh larutan sampel dengan konsentrasi 1000 ppm, dilakukan pengenceran dengan cara dipipet 1 mL larutan sampel 1000 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan dengan etanol 70% sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 100 ppm, lalu dipipet sebanyak 0,5 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan 1,5 mL etanol 70%, 0,1 mL aluminium klorida 10%, 0,1 mL kalium asetat 1 M dan ditambahkan air suling 2,8 mL kemudian kocok sampai homogen. Larutan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Kemudian dilakukan perhitungan kadar flavonoid menggunakan rumus metode Chang, dkk., (2002)

$$\text{Kandungan Flavonoid (\%)} = \frac{C \times V \times F_p \times 10^{-3}}{m} \times 100\%$$

Keterangan:

C = Kesetaraan Kuersetin (mg/L)

V = Volume total ekstrak etanol (mL)

F<sub>p</sub> = Faktor Pengenceran

m = Berat sampel (mg)

## Analisis Data

Data yang dikumpulkan pada penelitian ini adalah data deskriptif berdasarkan nilai kadar flavonoid ekstrak etanol daun kelakai dengan menggunakan rumus yaitu  $y = bx + a$  dimana  $y$  adalah absorbansi,  $b$  adalah slope,  $x$  adalah konsentrasi dan  $a$  adalah intersep, ditentukan

dengan cara menginterpolasikan data absorbansi sampel yang diperoleh dari alat spektrofotometer sehingga dapat diketahui konsentrasinya dan disajikan dalam bentuk grafik.

## **Hasil dan Pembahasan**

### **Penetapan Kadar Air Ekstrak Etanol Daun Kelakai**

Penetapan kadar air ekstrak etanol daun kelakai dilakukan menggunakan metode gravimetri. Prinsip metode gravimetri yaitu menghilangkan kadar air dalam sampel dengan pemanasan menggunakan oven pada suhu 105°C agar air yang terikat secara fisik dalam sampel dapat teruapkan sehingga diperoleh berat konstan (Latifah, 2015). Penetapan kadar air ekstrak etanol daun kelakai bertujuan untuk mengetahui kadar air yang terkandung pada ekstrak yang digunakan. Penentuan kadar air ini sangat penting dilakukan karena menentukan kesegaran dan daya tahan dari suatu ekstrak. Kadar air untuk ekstrak cair lebih dari 30%, ekstrak kental 5-30% dan ekstrak kering kurang dari 5% (Voigt, 1994). Hasil penetapan kadar air yang diperoleh dari ekstrak kental yaitu 19,71%, hasil yang diperoleh telah memenuhi persyaratan yang telah ditetapkan dimana kadar air yang besar dapat menyebabkan pertumbuhan mikroba, karena air merupakan media pertumbuhan mikroba (Supomo, dkk., 2016).

### **Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Kelakai**

Skrining fitokimia bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak. Hasil uji skrining fitokimia dapat dilihat pada tabel 1. Hasil skrining fitokimia dari penelitian yang dilakukan diketahui bahwa ekstrak etanol daun kelakai mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin dan triterpenoid. Penelitian Anggraeni dan Erwin (2015) juga menunjukkan bahwa kandungan metabolit sekunder yang terkandung di dalam daun kelakai yaitu senyawa alkaloid, steroid dan flavonoid. Perbedaan tersebut dikarenakan faktor lingkungan seperti iklim, cahaya, suhu udara, kelembaban, lingkungan perakaran (sifat fisika dan kimia tanah) dan ketersediaan air di dalam tanah memiliki pengaruh terhadap hasil metabolisme sekunder tumbuhan (Mahatrinny, dkk., 2014).

## Penetapan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Daun Kelakai

Penetapan kadar flavonoid ekstrak etanol daun kelakai dilakukan dengan kolorimetri dengan aluminium klorida. Analisis dilakukan dengan pembuatan larutan induk kuersetin, larutan seri standar, penentuan panjang gelombang, penentuan absorbansi kadar senyawa flavonoid dan kalibrasi hasil pengukuran dengan standar yang sudah dibuat. Kuersetin digunakan sebagai larutan induk karena kuersetin dapat membentuk kompleks antara  $AlCl_3$  dengan gugus keto pada atom C-4 dan juga dengan gugus hidroksil pada atom C-3 atau C5 yang bertetangga dari flavon dan flavonol (Chang, dkk., 2002), setelah dibuat larutan induk kuersetin selanjutnya dibuat serangkaian larutan standar 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm dari larutan induk kuersetin 100 ppm. Blanko pada penelitian ini yaitu etanol 70%,  $AlCl_3$  10%, kalium asetat 1 M dan air suling. Larutan kemudian diinkubasi selama 30 menit bertujuan agar reaksi berjalan sempurna, sehingga memberikan intensitas warna yang maksimal (Azizah, dkk., 2014)

**Tabel 1.** Hasil uji skrining fitokimia ekstrak etanol daun kelakai

No.	Uji Fitokimia	Hasil pengamatan
1.	Alkaloid	(+)
	Meyer	(+)
	Bouchardat	(+)
	Dragendorf	(+)
2.	Flavonoid	(+)
3.	Tanin	(+)
4.	Saponin	(+)
5.	Steroid	(-)
6.	Triterpenoid	(+)

Keterangan:

(+) = terdapat senyawa kimia

(-) = tidak terdapat senyawa kimia

Penambahan aluminium klorida bertujuan untuk membentuk kompleks dengan kuersetin (Indrayani, 2008), sedangkan penambahan kalium asetat pada penelitian ini untuk menstabilkan pembentukan

kompleks antara  $AlCl_3$  dengan kuersetin (Wahyulianingsih, 2016). Hasil pengukuran panjang gelombang menggunakan larutan standar 4 ppm diperoleh panjang gelombang maksimum yaitu 428 nm. Panjang gelombang maksimum tersebut kemudian digunakan untuk mengukur serapan kurva kalibrasi dan sampel ekstrak (Azizah, dkk., 2014). Pengukuran kurva kalibrasi bertujuan untuk mengetahui persamaan garis linier. Panjang gelombang yang didapat telah sesuai dengan panjang gelombang yang telah ditetapkan yaitu panjang gelombang kompleks dari 15 standar dengan aluminium klorida menunjukkan bahwa kompleks yang terbentuk oleh flavonol dengan C-3 dan C-5 kelompok hidroksil, seperti galangin, morin dan kaempferol, serta yang memiliki kelompok ekstra orto-dihidroksil seperti rutin, kuersetin, kuercitrin dan miricetin, maksimal absorbansi pada 415–440 nm (Chang, dkk., 2002). Hasil pengukuran absorbansi standar pada panjang gelombang 428 nm diperoleh data yang dapat dilihat pada tabel 2.

**Tabel 2.** Penentuan absorbansi larutan standar kuersetin

No.	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
1.	2	0,0263
2.	4	0,0398
4.	6	0,0517
5.	8	0,0651

Hasil penentuan absorbansi larutan standar tersebut dapat dilihat bahwa sesuai dengan hukum Lambert-Beer yaitu konsentrasi berbanding lurus dengan absorbansi dimana semakin tinggi nilai absorbansi akan berbanding lurus dengan konsentrasi zat yang terkandung didalam suatu sampel (Neldawati, dkk., 2013). Hasil pengukuran absorbansi larutan standar pada berbagai konsentrasi kurva kalibrasi, diperoleh persamaan regresi linier yaitu  $y = 0,006045x + 0,01513$  dengan nilai koefisien korelasi ( $r$ ) = 0,9979. Nilai  $r$  yang mendekati 1 menunjukkan kurva kalibrasi linier dan terdapat hubungan antara konsentrasi larutan kuersetin dengan nilai serapan (Azizah, dkk., 2014). Penetapan kadar flavonoid ekstrak

ekstrak etanol dilakukan dengan 4 kali pengulangan untuk mendapatkan keakuratan data dan didapatkan hasil yang terdapat pada tabel 3.

**Tabel 3.** Kadar flavonoid ekstrak etanol daun kelakai

No.	Sampel	Kadar flavonoid (%)	Rata-rata (%) ± SD
1.	Replikasi 1	2,2945	2,2159 ± 0,083
2.	Replikasi 2	2,1290	
3.	Replikasi 3	2,1621	
4.	Replikasi 4	2,2779	

Penelitian Suhartono, dkk., (2012) menemukan bahwa kadar flavonoid yang terdapat dalam ekstrak air daun kelakai memiliki rata-rata kadar flavonoid sebesar  $14,5 \mu\text{g/mL} \pm 0,7$  atau  $0,00145 \pm 0,00007\%$ . Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar flavonoid yang terdapat dalam ekstrak etanol daun kelakai memiliki rata-rata kadar flavonoid sebesar  $2,2159 \pm 0,083\%$ . Ekstrak etanol menghasilkan kadar flavonoid yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak air, hal ini menunjukkan bahwa pelarut etanol dapat mengekstrak senyawa flavonoid (Ukieyanna, 2012).

### Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat diketahui kadar flavonoid pada ekstrak etanol daun kelakai sebesar  $2,2159 \pm 0,083\%$ . etanol daun kelakai sebesar  $2,2159 \pm 0,083\%$ .

### C. Uji Aktivitas Sitotoksik Herba Kelakai Terhadap Sel Kanker Hati HepG2

Penyakit kanker merupakan salah satu penyakit yang mematikan pada manusia. Tahun 2020 terdapat kematian hampir 10 juta jiwa akibat dari kanker. Angka kejadian kanker akan terus meningkat setiap tahun dengan adanya penambahan penduduk. Kasus kanker hati pada tahun 2020 tercatat 830.000 kasus yang menyebabkan kematian (WHO 2021). Hepatocellular carcinoma (HCC) merupakan tumor ganas primer pada sel hepatosit (liver epithelial cells) dengan prognosis mengakibatkan kematian pada manusia cukup tinggi. Penderita HCC sekitar 70–90% memiliki

riwayat penyakit hepatitis kronik dan sirosis yang dapat disebabkan oleh virus hepatitis C, infeksi virus hepatitis B, mengonsumsi alkohol secara berlebihan, dan non-alcoholic steatohepatitis (NASH) (Sia *et al.* 2017, Apriyanto *et al.* 2018).

Kanker umumnya dapat dikarakterisasi dengan adanya mutasi pada gen penyebab kanker. Protein p53 dan caspase-3 banyak ditemukan pada sel-sel kanker. Secara normal, protein ini berperan dalam menjaga keseimbangan fisiologis antara proliferasi, apoptosis dan diferensiasi (Sari 2018).

Penderita kanker hati umumnya dapat dikarakterisasi dengan adanya mutasi pada gen penyebab kanker. Gen p53 dan caspase-3 merupakan dua gen yang banyak ditemukan pada sel-sel kanker. Gen p53 pada kondisi normal akan mengontrol siklus sel dan replikasi DNA (Wong 2011). Saat terjadi kerusakan DNA, p53 akan menahan sel untuk memasuki fase berikutnya dan memberikan waktu pada DNA untuk melakukan perbaikan. Bila kerusakan cukup parah, p53 akan menginisiasi terjadinya apoptosis sel (Sari 2018). Mekanisme aktivasi p53 tergantung pada sifat alami sinyal stres. Stres protein seluler akan mengaktifkan wild type p53 yang akan berfungsi sebagai pengatur protein yang memicu perubahan respons biologis sel. Aktivasi p53 tersebut akan menyebabkan pengaktifan gen target p53 sebagai contoh: respons kerusakan DNA akan menyebabkan putusannya rantai ganda DNA, ATM (ataxia telangiectasia mutated) protein kinase yang akan mengaktifkan Chk2 kinase. ATM dan Chk2 bersama-sama akan memfosforilasi p53 yang menyebabkan berhentinya siklus sel atau apoptosis (Prakosa *et al.* 2013, Sari 2018). Caspase-3 merupakan caspase eksekutor, aktivasi dari sekuensial caspase berperan penting pada fase eksekusi dari apoptosis sel. Aktivasi caspase memacu fragmentasi DNA dan digesti protein sel yang menyebabkan gangguan integritas sel, diikuti pengkerutan sel, kondensasi kromatin, membrane blebbing, dan pembentukan badan apoptosis yang kemudian akan didigesti oleh sel fagosit (Gimenez-Bonafe *et al.* 2009).

Banyak obat kanker yang memiliki efek resisten terhadap suatu gen dan efek samping yang besar terhadap tubuh, sehingga belakangan ini banyak dilakukan pengembangan obat yang berasal dari bahan alam. Salah satu herba yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen pengobatan herbal adalah herba kelakai. Herba kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f.) Bedd.) merupakan tumbuhan khas rawa yang tumbuh di Kalimantan Selatan (Syamsul *et al.* 2019).

Herba kelakai memiliki aktivitas antikolinergik (Chear *et al.* 2016), antibakteri (Rostinawati *et al.* 2018), antilarva *Aedes aegypti* (Suling *et al.* 2020), antioksidan (Chai *et al.* 2015, Arullappan *et al.* 2017, Nurhasnawati *et al.* 2019), antitumor (Margono *et al.* 2016), sitotoksik terhadap sel kanker payudara (MCF-7 dan MDA-MB-231) dan prostat (DU-145). Penelitian Arullappan *et al.* (2017) menyatakan bahwa fraksi terisolasi dari daun kelakai terhadap sel kanker HeLa memiliki aktivitas sitotoksik dengan nilai  $IC_{50}$  kurang dari 50%. Herba kelakai memiliki kandungan metabolit sekunder yaitu alkaloid, saponin, flavonoid, fenol, terpenoid, glikosida dan tanin (Chear *et al.* 2016, Pratiwi *et al.* 2016, Suryadini 2019, Syamsul *et al.* 2019). Kandungan metabolit sekunder didapatkan dari ekstraksi yang dilanjutkan dengan fraksinasi untuk pengelompokan suatu senyawa berdasarkan kepolaran. Flavonoid diketahui memiliki aktivitas menghambat proliferasi pada berbagai sel kanker maupun apoptosis. Alkaloid digunakan sebagai antitumor dan mampu menginduksi apoptosis (Chear *et al.* 2019).

Berdasarkan studi-studi yang telah dilakukan di atas, herba kelakai memiliki senyawa dengan aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker dan potensi untuk dikembangkan sebagai antikanker hepar. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan ekstrak dan fraksi herba kelakai memiliki aktivitas sitotoksik dan melihat pengaruh jumlah protein p53 dan caspase-3 terhadap sel kanker hati HepG2.

## **Bahan dan Metode**

### **Tempat dan waktu penelitian**

Ekstraksi dan fraksinasi herba kelakai dilakukan di Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta. Pengujian efek sitotoksik dengan metode MTT-assay, imunositokimia protein p53 dan caspase 3 yang dilakukan di Laboratorium Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Waktu penelitian dari November 2019–Februari 2020.

### **Alat dan bahan**

Alat yang digunakan adalah ayakan mesh 40, oven, moisture balance, kertas saring, evaporator, neraca analitik, tabung reaksi, sentrifuge Sigma 3K12 (B. Braun Biotech Internasional), inkubator 37 °C aliran CO<sub>2</sub> 5% model 6200 (Napco), Laminar air flow class II (Labconco), neraca elektrik (Sartorius), spektrokolorimeter pada alat ELISA reader (SLT 240 ATC), Neubauer haemocytometer (Olympus CKX41), autoklaf, tabung konikal steril (Nunclone), tissue culture flask (Nunclone), mikroplate 96 dan 24 sumuran (Nunclone), mikropipet 20–200 µL dan 200–1000 µL (Pipetman), mesin vortex, conical tube 15 mL, magnetic stirrer dan mikroskop inverted (Axiovert-25).

Bahan yang digunakan adalah herba kelakai yang telah dilakukan determinasi di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA, Universitas Sebelas Maret Surakarta, etanol 96%, n-heksan, etil asetat, air, lempeng KLT silika gel GF254, pereaksi Liebermann-Burchard, pereaksi sitroborat 1%, pereaksi Dragendorff, pereaksi asam sulfat anhidrat, pereaksi FeCl<sub>3</sub>, sel kanker hati HepG2, sel normal vero, media DMEM (Dulbecco's modified eagle medium), media M199, kontrol positif (cisplatin), Natrium bikarbonat, HEPES (Sigma), NaOH 1M, HCl 1M, aquadest, fetal bovine serum (FBS) 10% v/v (Gibco), Fungizon (Amphoterasin B) 0,5% v/v (Gibco), Penisillin-Streptomisin 2% v/v (Gibco), Dimetil sulfoksida (DMSO), Trypsin 0,5%, MTT, larutan phosphate buffered saline (PBS) pH 7,2. sodium dodesil sulfat (SDS) 10% dalam HCl 0,1 N, metanol, (blocking serum) hidrogen peroksida, prediluted blocking serum, antibodi primer

untuk antigen caspase-3 dan p53, xylool, mouting media dan novostatin universal detection kit.

### **Pembuatan ekstrak dan fraksi**

Herba kelakai yang sudah kering, digiling, diayak dengan mesh 40. Serbuk kering diekstraksi menggunakan etanol 96% dengan cara dimaserasi (perbandingan 1:10) pada suhu kamar selama 5 hari. Seluruh ekstrak dipekatkan menggunakan rotary evaporator (Darma *et al.* 2011). Pembuatan fraksi dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan alat corong pisah. Fraksinasi dilakukan berturut-turut dengan pelarut air, nheksan dan etil asetat. Fraksinasi dilakukan hingga warna pelarut jernih dan diperoleh fraksi n-heksan, etil asetat dan fraksi air. Hasil dari fraksinasi dipekatkan dengan rotary evaporator (Uthia *et al.* 2017).

### **Identifikasi kandungan senyawa sitotoksik**

Identifikasi flavonoid, menggunakan fase diam lempeng KLT (kromatografi lapis tipis) silika gel GF<sub>254</sub> dengan eluen n-heksan: etil asetat: asam formiat (6:4:0,2). Perbandingan yang digunakan yaitu kaempferol. Hasil KLT dideteksi dengan menggunakan pereaksi semprot sitroborat. Hasil positif menunjukkan warna kuning atau orange pada sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm (Nurmilatina 2017).

Identifikasi alkaloid, menggunakan fase diam lempeng KLT silika gel GF<sub>254</sub> dengan eluen etil asetat: methanol: air (90:9:1). Perbandingan yang digunakan kafein. Hasil KLT dideteksi dengan menggunakan pereaksi Dragendorff. Hasil positif menunjukkan warna jingga pada sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm (Nurmilatina 2017).

Identifikasi saponin, menggunakan fase diam lempeng KLT silika gel GF<sub>254</sub> dengan eluen kloroform: methanol: air (60:30:10). Hasil KLT dideteksi dengan menggunakan pereaksi anisaldehyd asam sulfat pekat, dipanaskan pada suhu 110 °C selama 5–10 menit. Hasil positif menunjukkan warna biru atau biru violet, kadang kekuningan (Pratiwi *et al.* 2016, Nurmilatina 2017).

Identifikasi tanin, menggunakan fase diam lempeng KLT silika gel GF<sub>254</sub> dengan eluen toluena: etil asetat (3:1). Hasil KLT dideteksi pereaksi semprot ferri sulfat. Hasil positif menunjukkan warna biru kehitaman menandakan tanin galat dan berwarna hijau kehitaman menandakan tanin katekol pada sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm (Nurmilatina 2017, Suryadini 2019).

Identifikasi triterpenoid, menggunakan fase diam lempeng KLT silika gel GF<sub>254</sub> dengan eluen n-heksanetil: asetat (7:3). Pemandangan yang digunakan stigmasterol. Hasil KLT dideteksi dengan menggunakan pereaksi semprot Liebermann-Burchard. Hasil positif menunjukkan warna biru keunguan sampai kecoklatan pada sinar UV dengan panjang gelombang 254 dan 366 nm (Nurmilatina 2017).

### **Pembuatan suspensi dan penghitungan sel**

Sel HepG2 dan sel vero aktif dalam PBS disentrifugasi dengan kecepatan 1.200 rpm selama 10 menit. Endapan yang terbentuk ditambah media penumbuh DMEM untuk sel HepG2 dan media M199 untuk sel vero. Sel diinkubasi 37 °C selama 24 jam. Setelah 24 jam, dilakukan pemisahan antara sel dan medium dengan disentrifugasi. Sel diamati di bawah mikroskop untuk memperkirakan jumlah sel mencapai konfluen (70–80%). Sel yang telah konfluen dilakukan pemanenan. Pemanenan dengan cara sel dicuci dengan PBS 2 kali, ditambahkan 1 mL tripsin lalu diinkubasi selama 3–5 menit. Hasil diamati pelepasan sel dari dasar plate dengan mikroskop. Sel dalam conical steril ditambah media penumbuh sebanyak 2 mL untuk menghentikan kerja tripsin. Media sebanyak 10 mL ditambahkan dan disentrifugasi dengan kecepatan 1.500 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, endapan ditambahkan 3 mL media dan diresuspensikan. Terakhir diambil 10 µL dan dipipetkan ke hemositometer, kemudian sel dihitung di bawah mikroskop inverted (CCRC 2009a).

### **Uji sitotoksisitas dan indeks selektivitas**

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode MTT (3-[4,5- dimetilthiazol-2yl] 2,5-difeniltetrazolium bromide). Larutan

uji 100  $\mu\text{L}$  dengan konsentrasi 500; 250; 125; 62,5; dan 31,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  disuspensikan dengan 100  $\mu\text{L}$  dalam media penumbuh DMEM untuk sel HepG2 sedangkan M199 untuk sel vero kemudian dimasukkan ke dalam microplate 96 sumuran. Sel diinkubasi pada inkubator  $\text{CO}_2$  5% pada suhu 37  $^\circ\text{C}$  selama 24 jam. Akhir inkubasi medium dibuang, dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali, kemudian ditambahkan 100  $\mu\text{L}$  MTT 0,3% ke dalam microplate 96 sumuran dan diinkubasikan kembali selama 4 jam. Sel hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formazan berwarna ungu dan untuk menghentikan reaksi antara sel dengan MTT serta melarutkan formazan maka ditambahkan 100  $\mu\text{L}$  SDS 10% dalam 0,1 N HCl. Plate kemudian dibungkus dengan kertas aluminium foil, diinkubasi 24 jam pada suhu kamar. Serapan dibaca dengan menggunakan spektrofotometer pada alat ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm kemudian diperoleh data absorbansi yang dikonversikan dalam persen viabilitas dan dihitung nilai  $\text{IC}_{50}$  (Istiqomah *et al.* 2015, CCRC 2019b).

Nilai  $\text{IC}_{50}$  dihitung menggunakan persamaan regresi linier yang menggambarkan hubungan antara persentase viabilitas sel HepG2 dan sel normal dengan log konsentrasi sampel uji yaitu  $y = a + bx$ . Nilai  $y$  menggambarkan persen viabilitas, nilai  $x$  menggambarkan log konsentrasi senyawa, dan nilai  $\text{IC}_{50}$  menggambarkan antilog  $x$ . Rentang nilai  $\text{IC}_{50}$  bila  $\text{IC}_{50} < 200 \mu\text{g mL}^{-1}$  memiliki efek sitotoksik sedang dan  $200 > \text{IC}_{50} < 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  memiliki efek sitotoksik lemah. Nilai  $\text{IC}_{50} > 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  dinyatakan tidak memiliki aktivitas sitotoksik (Fatmawati 2018). Indeks selektivitas (SI) diperoleh dari nilai  $\text{IC}_{50}$  sel HepG2 dibandingkan dengan nilai  $\text{IC}_{50}$  sel normal. Ekstrak dan fraksi dinyatakan selektif bila nilai  $\text{SI} \geq 3$ , dan dikatakan kurang selektif bila nilai  $\text{SI} \leq 3$  (Sirait dan Setyaningsih 2019).

### Uji imunositokimia

Sel HepG2 dengan kepadatan  $5 \times 10^4$  sel/sumuran ditanam di atas cover slips sampai konfluen 80%. Sampel dengan konsentrasi  $2 \times$  nilai  $\text{IC}_{50}$ ;  $1 \times$  nilai  $\text{IC}_{50}$ ;  $\frac{1}{2} \times$  nilai  $\text{IC}_{50}$ , media kultur dan kontrol positif (cisplatin) sebanyak 1000  $\mu\text{L}$  dimasukkan ke dalam microplate 96 sumuran dan

diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Sel difiksasi dengan metanol kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 4 °C dan dicuci dengan PBS 1 kali. Letakkan cover slips ke dalam sumuran 6 well plate yang bersih dan diberi label.

Sel ditetaskan 3–4 tetes larutan hidrogen peroksida (blocking solution) pada suhu ruang dan ditambahkan prediluted blocking serum (background sniper) diinkubasi selama 10 menit dan dibuang, ditambah sebanyak 100 µL secara berurut antibodi monoklonal primer untuk antingen p53 dan caspase-3, antibodi sekunder kemudian dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali, ditambahkan 100 µL reagen streptavidinenzim peroksidase diinkubasi selama 30 menit dan dicuci dengan PBS 2 kali 100 µL ditambahkan larutan substrat kromogen DAB (3,3'-diaminobenzidine) diinkubasi 10 menit dan dicuci dengan aquades, ditambahkan 100 µL larutan Mayer's haematoxylin dan dicuci dengan aquadest. Cover slip ditetaskan 2–3 tetes xylol kemudian dikeringkan dan ditetaskan sebanyak 2–3 tetes larutan alkohol. Cover slip diletakkan di atas object glass, ditetesi lem (mounting media) dan ditutup dengan cover slip kotak. Ekspresi protein diamati dengan mikroskop. Sel yang mengekspresikan protein p53 dan caspase-3 akan memberikan warna coklat/gelap, sedangkan tidak mengekspresikan protein p53 dan caspase-3 akan memberikan warna ungu/ biru (CCRC 2009a).

### **Analisis data**

Data yang diperoleh dilakukan perhitungan persentase sel yang terekspresi secara kuantitatif menggunakan aplikasi software image J versi Java 1.8.0\_40 (64-bit) dengan pengamatan 1 lapang pandang 3 kali replikasi. Analisis data nilai  $IC_{50}$  tiap perlakuan dan data kuantitatif ekspresi protein p53 dan caspase-3 diuji dengan statistik SPSS 21. Uji statistik dengan menggunakan uji one way ANOVA dilanjutkan dengan uji Post Hoc test dengan perbedaan bermakna pada nilai sig.  $p < 0,05$ .

## Hasil dan Pembahasan

Hasil ekstraksi herba kelakai dengan etanol 96% didapatkan ekstrak kental dengan rendemen sebesar 5,30% dari berat serbuk kering sebesar 1000 g dan berat ekstrak 53 g. Hasil ekstrak difraksinasi dengan pelarut n-heksan, etil asetat dan air dapat dilihat pada Tabel 1. Berdasarkan tabel, fraksi N-heksan memiliki rendemen yang lebih banyak. Hal ini mungkin disebabkan banyaknya senyawa sekunder yang bersifat non polar seperti alkaloid, terpenoid dan steroid yang tersari secara optimal.

Identifikasi kandungan kimia menggunakan metode KLT dilakukan pada ekstrak, fraksi n-heksan, etil asetat dan air terhadap golongan senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, tanin dan triterpenoid. Senyawa yang diidentifikasi merupakan senyawa yang memiliki aktivitas antikanker. Hasil identifikasi kandungan senyawa tersebut dapat dilihat pada Tabel 2.

Hasil KLT menunjukkan bahwa ekstrak herba kelakai positif mengandung golongan senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, tanin dan triterpenoid. Sedangkan pada fraksi nheksan, etil asetat dan air hanya memiliki beberapa dari kandungan kimia saja yang disari berdasarkan kepolarannya. Fraksi n-heksan memiliki sifat non polar sehingga golongan senyawa alkaloid yang bersifat non polar dan triterpenoid tersari ke dalam fraksi n-heksan. Fraksi etil asetat yang bersifat semi polar mensari golongan senyawa flavonoid, alkaloid, dan tanin yang bersifat semi polar. Fraksi air yang memiliki sifat polar menarik golongan senyawa alkaloid dan saponin yang bersifat polar.

**Tabel 1.** Hasil pembuatan fraksi herba kelakai

Sampel	Berat Ekstrak (g)	Berat Fraksi (g)	Rendemen (%)
Fraksi n-heksan	20	12,33	61,68
Fraksi etil asetat	20	1,46	7,29
Fraksi air	20	4,10	20,49

**Tabel 2.** Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak herba kelakai

Uji	Flavonoid	Alkaloid	Saponin	Tanin	Triterpenoid
Ekstrak	+	+	+	+	+
Fraksi n-heksan	-	+	-	-	+
Fraksi etil asetat	+	+	-	+	-
Fraksi air	-	+	+	-	-

Hasil perhitungan jumlah sel kanker HepG2 yang hidup dalam stok suspensi sel adalah  $88 \times 10^4$  sel  $\text{mL}^{-1}$  dan pada sel vero, sel kanker yang hidup dalam stok suspensi adalah sel vero  $155 \times 10^4$  sel  $\text{mL}^{-1}$ . Uji sitotoksik dilakukan dengan seri konsentrasi ekstrak dan fraksi sebesar 500; 250; 125; 62,5; 31,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  menggunakan pelarut DMSO 0,1%. Pelarut DMSO merupakan pelarut senyawa polar maupun non polar dan tidak bersifat toksik serta tidak memberikan aktivitas apapun. Hasil uji sitotoksik ekstrak dan fraksi herba kelakai dapat diamati melalui pengamatan morfologi sel, dimana sel mengalami pengkerutan, kondensasi kromatin, plasma membran mengalami abnormal dan sel menjadi sirkuler (Yu *et al.* 2013).

Aktivitas uji sitotoksik ekstrak dan fraksi herba kelakai menunjukkan dose dependent, yaitu viabilitas sel berkurang seiring bertambahnya konsentrasi ekstrak dan fraksi herba kelakai. Hasil nilai  $\text{IC}_{50}$  yang paling rendah terdapat pada fraksi etil asetat dengan rata-rata nilai  $\text{IC}_{50}$  sebesar 224,12  $\mu\text{g mL}^{-1}$  sedangkan nilai  $\text{IC}_{50}$  kontrol positif (cisplatin) sebesar 28,63  $\mu\text{g mL}^{-1}$  dengan nilai r semua sampel  $>0,9$ . Nilai  $\text{IC}_{50}$  kurang 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  memiliki efek sitotoksik yang sangat kuat, nilai  $\text{IC}_{50}$  50–200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  memiliki efek sitotoksik sedang, nilai  $\text{IC}_{50}$  200–1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  memiliki efek sitotoksik lemah dan nilai  $\text{IC}_{50}$  lebih 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  dinyatakan tidak memiliki aktivitas sitotoksik (Fatmawati *et al.* 2018). Berdasarkan dari kriteria tersebut dapat disimpulkan bahwa ekstrak dan fraksi n-heksan herba kelakai pada penelitian ini menunjukkan aktivitas sitotoksik yang lemah terhadap sel kanker HepG2 sedangkan fraksi air tidak memiliki aktivitas sitotoksik.

Ekstrak dan fraksi yang memiliki sifat sitotoksik terhadap sel kanker juga harus memiliki nilai indeks selektivitas yang menunjukkan tingkat keamanan atau selektivitas sitotoksik dari ekstrak dan fraksi herba kelakai

terhadap sel kanker dan sel normal. Ekstrak dan fraksi dikatakan selektif bila mempunyai nilai indeks selektivitas  $\geq 3$  (Istiqomah *et al.* 2015, Mutiah *et al.* 2017). Hasil perhitungan indeks selektivitas ekstrak dan fraksi herba kelakai dapat dilihat pada Tabel 3. Nilai indeks selektivitas tersebut dapat dinyatakan bahwa fraksi etil asetat herba kelakai memiliki tingkat selektivitas yang tinggi dalam menghambat pertumbuhan sel, artinya fraksi etil asetat herba kelakai memiliki potensi sitotoksik terhadap sel kanker tetapi juga memiliki tingkat keamanan yang baik terhadap sel normal.

Nilai  $IC_{50}$  ekstrak dan fraksi herba kelakai yang besar diduga karena berbagai faktor yang mempengaruhinya, seperti kompleksitas senyawa yang terkandung alkaloid, flavonoid, tanin, fenolik, saponin dan triterpenoid di dalam ekstrak dan fraksi tersebut dapat memungkinkan mempengaruhi aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker. Golongan senyawa alkaloid yang ditarik oleh fraksi n-heksan dan etil asetat diduga memiliki aktivitas antitumor dan mampu menginduksi apoptosis melalui ikatannya dengan DNA, topoisomerase I, dan penstabilan kompleks topoisomerase-DNA terpotong. Penstabilan kompleks pemotongan ini akan menyebabkan kerusakan pilinan ganda DNA yang permanen sehingga mengarah terjadinya apoptosis (Sari 2018). Golongan senyawa fenolik dan flavonoid yang ditarik fraksi etil asetat diduga memiliki aktivitas sitotoksik pada sel kanker hati HepG2 melalui penghambatan kinetika proliferasi dan induksi apoptosis melalui aktivasi caspase-3 tanpa meningkatkan ekspresi protein Bax. Golongan senyawa flavonoid pada herba kelakai menghambat aktivitas topoisomerase DNA I/II, membantu penurunan ROS (reactive oxygen species), regulasi ekspresi heat shock protein, modulasi jalur apoptosis, aktivasi caspase-9 dan caspase-3, penurunan ekspresi faktor transkripsi nuclear factor kappaB (NF-kappaB), aktivasi endonuklease, dan penurunan protein Mcl-1 (Mardiyarningsih dan Ismiyati 2014, Chear *et al.* 2016, Sari 2018). Golongan senyawa flavonoid yang ada di herba kelakai adalah kaempferol, katekin, antosianin dan 2,3-dihidro-3,5- dihidroksi-6-metil-4H-piranon yang memiliki aktivitas antikanker (Nurmilatina 2017). Fraksi etil asetat diduga mensari senyawa metabolit sekunder lebih banyak

seperti golongan senyawa alkaloid, saponin, flavonoid, fenol, terpenoid, glikosida dan tanin, sehingga nilai  $IC_{50}$  dari persen viabilitas pada fraksi etil asetat lebih kecil dibanding fraksi n-heksan.

**Tabel 3.** Hasil perhitungan indeks selektivitas ekstrak dan fraksi herba kelakai

Sampel	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) Sel HepG2	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) Sel Vero	Nilai Indeks Selektivitas*
Ekstrak	865,84	1300,12	1,50
Fraksi n-heksan	568,38	1525,34	2,68
Fraksi etil asetat	224,12	704,03	3,14
Fraksi air	3950,28	265722,20	67,27
Kontrol positif (cisplatin)	28,63	46,44	1,62

**Tabel 4.** Hasil persentase ekspresi p53 dan caspase-3

Perlakuan	Konsentrasi $\mu\text{g mL}^{-1}$	Rata-rata Luas Area Ekspresi p53 (%) $\pm$ SD	Rata-rata Luas Area Ekspresi Caspase-3 (%) $\pm$ SD
Ekstrak	2 $IC_{50}$ (1731,68)	2,19 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>	2,78 $\pm$ 0,97
	$IC_{50}$ (865,84)	15,12 $\pm$ 0,67 <sup>a</sup>	17,92 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>
	1/2 $IC_{50}$ (432,92)	8,44 $\pm$ 0,74 <sup>a</sup>	9,98 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup>
Fraksi etil asetat	2 $IC_{50}$ (112,06)	2,33 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>	6,85 $\pm$ 0,62 <sup>ab</sup>
	$IC_{50}$ (224,12)	7,82 $\pm$ 0,92 <sup>a</sup>	4,96 $\pm$ 0,48 <sup>b</sup>
	1/2 $IC_{50}$ (448,24)	6,26 $\pm$ 0,57 <sup>ab</sup>	12,96 $\pm$ 1,25 <sup>a</sup>
Kontrol positif (cisplatin)	28,63	4,11 $\pm$ 0,40 <sup>b</sup>	3,31 $\pm$ 0,43 <sup>b</sup>
Sel kontrol	—	5,18 $\pm$ 0,39 <sup>a</sup>	5,88 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>

Keterangan:

- Berbeda bermakna dengan kontrol positif ( $p < 0,05$ )
- Tidak terdapat perbedaan bermakna dengan sel control ( $p > 0,05$ )

Fraksi air memiliki sifat polar, dimana kandungan senyawa yang tersari bersifat polar. Kandungan senyawa herba kelakai bersifat polar tidak memiliki aktivitas menghambat sel kanker. Hal ini diduga karena senyawa yang sulit menembus membran sel kanker yang bersifat non polar (hidrofobik). Sel kanker dan sel normal terdiri dari membran sel dengan penyusun berupa P-glikoprotein yang merupakan pelindung sel

dan bersifat hidrofobik (non polar) sehingga obat yang masuk biasanya mengalami bypassing atau adanya efflux pengeluaran obat (Wong 2011).

Uji imunositokimia ini bertujuan untuk melihat aktivitas ekstrak dan fraksi herba kelakai terhadap ekspresi protein supresor yaitu p53 dan pro-apoptosis yaitu caspase-3, dimana protein ini memiliki peran penting dalam mekanisme regulasi sel untuk mengontrol program kematian sel (Moningka 2019). Pengujian ini dilakukan pada tiga kelompok perlakuan yaitu kelompok tanpa perlakuan (sel kontrol), kontrol positif (cisplatin), dan kelompok yang diberi ekstrak dan fraksi etil asetat dengan masing-masing konsentrasi yaitu konsentrasi pada Tabel 4. Ekspresi p53 dan caspase-3 ditunjukkan dengan adanya ikatan antara protein dengan masing-masing antibodi monoklonal dan antibodi yang digunakan adalah antibodi p53 dan caspase-3 yang mendeteksi berupa warna coklat/gelap pada sitoplasma dan membrane sel (Prakosa *et al.* 2013, CCRC 2019a).

Warna coklat yang dihasilkan oleh sel yang terekspresi akibat adanya perubahan warna dari reagen DAB oleh antibodi p53 dan caspase-3 yang diberikan kepada sel kanker, sedangkan warna ungu yang dihasilkan akibat adanya penambahan reagen haematoxylin sebagai counterstain untuk memudahkan pengamatan terhadap sel yang mengekspresi p53 dan caspase-3, sehingga sel yang tidak diberikan perlakuan seperti sel kontrol tidak menunjukkan warna coklat karena reagen DAB tidak bereaksi dengan antibodi sehingga sel hanya akan terwarnai oleh reagen haematoxylin yang berwarna ungu (CCRC 2009a).

Hasil analisis data ekspresi protein menggunakan software image J versi Java 1.8.0\_40 (64-bit) dapat dilihat pada Tabel 4. Semakin besar konsentrasi menunjukkan semakin besar luas area yang terekspresi p53 dan caspase-3 pada sel kanker HepG2. Kelompok sel kontrol dengan pemberian antibodi p53 memiliki hasil persentase area terekspresi yang lebih kecil dibanding persen ekspresi yang diberi perlakuan. Hal ini dapat diartikan bahwa terjadinya peningkatan ekspresi protein p53. Hasil analisis statistik menunjukkan ada perbedaan bermakna dengan nilai sig.  $p < 0,05$  antara ekstrak herba kelakai dan kelompok sel kontrol positif dengan

kelompok ekstrak. Fraksi etil asetat tidak ada perbedaan yang bermakna antar kelompok sel HepG2 dengan kontrol positif dan fraksi etil asetat herba kelakia  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub>. Untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok konsentrasi perlakuan, maka dilakukan pengujian statistik pada p53 dan caspase-3. Jumlah protein pada p53 terjadi perbedaan bermakna dengan nilai sig.  $p < 0,05$  secara statistik pada ekstrak herba kelakia terdapat antara kelompok sel kontrol positif dengan kelompok ekstrak 2 IC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub>,  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub>, fraksi etil asetat 2 IC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub>,  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub>.

Mekanisme sitotoksik ekstrak dan fraksi herba kelakia diduga adanya cellular stress yang membuat ekspresi protein p53 meningkat, sehingga mengakibatkan terjadinya fase G1 arrest (penghentian siklus sel) atau apoptosis. Anggota dari apoptosis stimulating protein p53 (ASPP), yaitu ASPP 1 dan ASPP 2 secara spesifik menstimulasi fungsi trans aktivasi p53 pada promotor gen proapoptotik seperti Bax dan p53 inducible gene 3 (PIG 3), tapi tidak pada promotor gen yang menyebabkan cell cycle arrest, yaitu p21 dan MDM2. Aktivitas p53 akan mempertahankan sel pada check point sampai kerusakan DNA dapat diperbaiki. Kerusakan DNA irreversible, p53 akan menginduksi apoptosis. Rangsangan ligan terhadap reseptor menyebabkan trimerisasi dan menginduksi pembentukan death-inducing signaling complex (DISC) yang mengandung adaptor sitoplasma spesifik dan caspase-8. Beberapa protein adaptor misalnya Fas-associated death domain (FADD) berikatan dengan reseptor CD95 dan DR4/5, sedangkan TNF-R-associated death domain (TRADD) berasosiasi dengan TNFR1. Protein adaptor FADD akan mengikat caspase-8/caspase-10 yang disebut death effector domain (DED). Caspase-8 yang teraktivasi (heterotetramer) dilepaskan dari DISC ke sitoplasma. Caspase-8 termasuk caspase inisiator yang akan mengaktivasi caspase eksekutor terutama melalui pro caspase-3 yang akan membawa ke program kematian sel. p53 berfungsi sebagai faktor transkripsi gen-gen yang berperan penting pada penghentian siklus sel, perbaikan DNA dan apoptosis. Hilangnya fungsi p53 pada beberapa sel kanker menyebabkan terjadinya instabilitas genomik, kegagalan regulasi siklus sel dan hambatan apoptosis (Prakosa *et al.* 2013, Sari 2018).

Jumlah ekspresi caspase-3 secara statistik pada ekspresi caspase-3 ekstrak herba kelakai terdapat perbedaan yang bermakna dengan nilai sig.  $p < 0,05$  antara ekstrak  $IC_{50}$ ,  $\frac{1}{2} IC_{50}$ , fraksi etil asetat  $2 IC_{50}$ ,  $\frac{1}{2} IC_{50}$  dan sel kontrol terhadap kontrol positif. Nilai sig  $p > 0,05$  tidak terjadi perbedaan yang bermakna antara fraksi etil asetat  $2 IC_{50}$ ,  $IC_{50}$  terhadap sel kontrol. Hal tersebut menunjukkan pada konsentrasi tertinggi yaitu  $1731,67 \mu\text{g mL}^{-1}$  pada ekstrak dan fraksi etil asetat herba kelakai mampu meningkatkan persen ekspresi pada sel kanker sehingga membuat sel tersebut mengalami apoptosis atau kematian sel dan terjadi pemecahan sel.

Kemampuan ekstrak dan fraksi dalam mengekspresi caspase-3 pada penelitian ini dapat melalui dua jalur, yaitu jalur ekstrinsik dengan meningkatkan death receptor seperti TNF dan Fas-L agar dapat memodulasi caspase-8 melalui pembentukan death-inducing signaling complex (DISC) yang kemudian melakukan aktivasi terhadap caspase-3 atau melalui jalur intrinsik yaitu dengan meningkatkan protein BAX dan BAK yang merupakan protein pengatur keluarnya sitokrom-c pada mitokondria dan menekan protein Bcl-2 sehingga terjadi ikatan antara sitokrom-c, Apaf-1, dan caspase-9 yang membentuk suatu kompleks yang disebut apoptosom yang akan melakukan aktivasi ke caspase-3. Protein caspase-3 yang teraktivasi akan memecah protein pada lapisan inti sel seperti endonuklease, kemudian merusak benang kromatid pada kromosom sehingga fase mitosis terhambat. Sel akan berhenti melakukan proliferasi karena inti sel rusak, dan mengalami kematian sel atau apoptosis sel. Protein caspase-3 juga akan mengaktivasi protein p21 activated kinase yang akan membentuk badan apoptosis pada sel yang mengalami kematian, badan apoptosis ini berfungsi memberi sinyal kepada sel makrofag untuk melakukan fagositosis (Prakosa *et al.* 2013, Sari 2018). Studi ini baru meneliti uji sitotoksik herba kelakai terhadap sel kanker HepG2 pada protein p53 dan Caspase-3 sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap beberapa protein tertentu seperti BAX, BAD, MEKK, MAX dan lain-lain untuk mengetahui jalur sel apoptosis.

## Kesimpulan

Ekstrak fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat herba kelakai (*S. palustris* (*Burm.f.*) Bedd.) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap kultur sel kanker hati HepG2 dengan nilai IC<sub>50</sub> 865,84; 568,38 dan 224,12  $\mu\text{g mL}^{-1}$  , sedangkan fraksi air tidak beraktivitas sitotoksik karena memiliki nilai IC<sub>50</sub> > 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  . Fraksi etil asetat memiliki tingkat keamanan dengan mempunyai nilai indek selektivitas  $\geq 3$ . Etil asetat adalah fraksi teraktif dari herba kelakai yang dapat meningkatkan ekspresi protein p53 dan caspase-3 pada sel kanker hati HepG2 dengan konsentrasi 112,06 – 448,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  . Golongan senyawa flavonoid, alkaloid, dan tanin yang diduga memiliki potensi sebagai sitotoksik terhadap sel kanker hati HepG2.



## Bab 3

### Keamanan Penggunaan Ekstrak Kelakai

#### A. Uji Toksisitas Ekstrak Kelakai Berdasarkan Pemeriksaan Histopatologi Ginjal

---

##### **Pendahuluan**

Kalimantan Selatan memiliki berbagai jenis paku-pakuan yang berpotensi sebagai tanaman obat. Berdasarkan data empiris, *Stenochlaena palustris* dimakan sebagai sayuran dan digunakan sebagai pelancar ASI serta obat alternatif untuk menyembuhkan anemia dan alergi serta meredakan demam. Kebutuhan masyarakat akan bahan herbal semakin meningkat karena perkembangan dan kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi yang semakin pesat, sehingga mendorong berkembangnya obat-obatan alternatif yang berasal dari bahan alami. Selain itu, bahan-bahan alami ini lebih terjangkau dan lebih mudah diperoleh dibandingkan dengan obat yang dibuat dengan bahan kimia dan dianggap memiliki efek samping yang minimal. Daun *Stenochlaena palustris* mengandung berbagai macam metabolit sekunder. Berdasarkan hasil skrining fitokimia oleh Debnath dkk., ekstrak etanolik daun *Stenochlaena palustris* mengandung flavonoid, saponin, alkaloid, steroid, dan tanin. Flavonoid memiliki kandungan

503,56 mg QE/g. Alkaloid, saponin, steroid, tanin, dan total fenol masing-masing sebesar 11,56%, 8,06%, 3,43%, 23 mg GAE/g, dan  $51,69 \pm 1,28$  mg GAE/g. Tanin merupakan antioksidan yang mempercepat proses epitelisasi. Steroid dan saponin bersifat antiinflamasi dan antiseptik.

Ada beberapa penelitian tentang ekstrak daun *Stenochlaena palustris*. Salah satunya menguji toksisitas sel fibroblas BHK-21 dan menyimpulkan bahwa konsentrasi 10%, 20%, dan 30% dari ekstrak daun *Stenochlaena palustris* bersifat toksik terhadap fibroblas BHK-21. Sebagai perbandingan, konsentrasi 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, dan 90% terbukti tidak toksik terhadap sel fibroblas BHK-21. Penelitian ini menyimpulkan bahwa ekstrak daun *Stenochlaena palustris* dapat meningkatkan viabilitas sel karena mengandung flavonoid dengan fungsi antioksidan non-enzimatik yang menghambat kerusakan sel yang disebabkan oleh reactive oxygen species (ROS).

Oleh karena itu, antioksidan pada daun *Stenochlaena palustris* memiliki potensi untuk menyembuhkan luka karena kemampuannya dalam pembentukan jaringan granular, proliferasi fibroblast, dan produksi serat kolagen. Penelitian belum menemukan toksisitas atau efek samping dari produk herbal *Stenochlaena palustris* yang digunakan sebagai obat untuk menyembuhkan luka. Produk ini telah digunakan secara luas di masyarakat. Beberapa faktor seperti ketepatan dosis, ketepatan waktu, dan cara penggunaan harus diperhatikan dalam penggunaan pengobatan alami seperti daun *Stenochlaena palustris* sebagai obat penyembuh luka. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengujian lebih lanjut untuk melindungi masyarakat pengguna dari efek yang berpotensi merugikan dan untuk memastikan keamanan penggunaannya. Data bahaya diperoleh dengan menggunakan uji toksisitas yang mendeteksi efek racun suatu zat pada sistem biologis dan menerima data respons dosis spesifik dari sediaan uji. Uji ini mendeteksi keberadaan racun dalam suatu zat dan menentukan organ target racun serta sensitivitasnya setelah pemberian senyawa secara akut selama 14 hari. Parameter uji toksisitas ini meliputi gejala klinis, kematian subjek, dan histopatologi organ

Ginjal sering kali menerima efek obat yang tidak diinginkan. Misalkan kandungan ekstrak yang masuk ke dalam tubuh melebihi kondisi normal. Dalam hal ini, akan menurunkan kemampuan ginjal untuk memekatkan zat-zat xenobiotik di dalam sel, sehingga terjadi penumpukan zat-zat toksik yang menyebabkan kerusakan pada ginjal. Aliran darah yang relatif tinggi ke ginjal membuat ginjal terpapar zat-zat yang terbawa dalam sistem peredaran darah, sehingga zat-zat toksik dengan cepat dapat merusak ginjal dan menyebabkan perubahan struktur serta fungsi. Kerusakan pada nefron dapat terjadi pada tubulus, sel ginjal, dan kapiler. Kondisi toksisitas yang biasa ditemukan pada ginjal antara lain nekrosis sel, degenerasi sel, dan perdarahan.<sup>11</sup> Selanjutnya, penelitian ini menganalisis efek toksik dari tiga ekstrak daun *Stenochlaena palustris* yang berbeda (2.000, 2.500, dan 3.000 mg/kg/berat badan) berdasarkan perdarahan dan nekrosis yang ditemukan pada jaringan ginjal dengan menggunakan pemeriksaan histopatologi.

### **Bahan dan Metode**

Uji coba ini menggunakan 16 ekor tikus Wistar jantan (*Rattus novergicus*) berusia 8-12 minggu, dengan berat badan antara 200-250 g, dan dalam kondisi sehat. Tikus Wistar biasanya makan 20% dari total berat badan mereka, jadi dalam adaptasi laboratorium, mereka diberi makan 40 g sekali sehari selama satu minggu. Air matang diberikan dalam botol 500 ml. Subjek dikelompokkan secara acak sederhana dan dibagi menjadi empat kelompok, masing-masing terdiri dari empat tikus. Protokol penelitian ini telah disetujui oleh komite etik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Lambung Mangkurat dengan nomor registrasi 016/KEPKG-FKGULM/EC/III/2022.

Daun dewasa berwarna kehijauan (12 kg) dari *Stenochlaena palustris* diambil di daerah Anjir Barito Kuala. Daun dicuci, dipotong kecil-kecil, dan dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C selama empat jam. Setelah itu, daun dihancurkan dengan blender dan dimaserasi dengan etanol 95% selama 72 jam. Setelah selesai, larutan disaring dengan kertas saring WH40 hingga diperoleh cairan bening kecoklatan. Pada tahap selanjutnya, pelarut

diuapkan dengan vacuum rotary evaporator selama empat sampai enam jam. Kemudian dipanaskan dengan penangas air untuk mendapatkan residu cairan berwarna kecoklatan. Bebas etanol diuji dengan kalium dikromat ( $K_2Cr_2O_7$ ) pada 3 ml etanol. Ekstrak kemudian disimpan dalam lemari es bersuhu  $10^\circ C$  untuk mencegah oksidasi. Dosis ekstrak dibuat dengan mengencerkan ekstrak dengan air suling.

Uji toksisitas dilakukan dengan memberikan *Stenochlaena palustris* per-oral kepada subjek dengan probe lambung dua kali sehari selama 14 hari. Subjek dibagi menjadi empat kelompok yang tercantum dalam Tabel 1. Pada akhir perlakuan, subjek dipuasakan dan hanya diberi air putih selama 8-12 jam.

Pada hari ke-15, subjek dikorbankan dengan memberikan injeksi intraperitoneal menggunakan 0,5 ml ketamin. Ginjal dikumpulkan, dibersihkan, dibungkus dengan kain putih, dan dikubur dengan kedalaman  $\pm 50$  cm. Ginjal kemudian dicuci dengan NaCl dan direndam dengan larutan BNF 10% untuk fiksasi jaringan dan diproses lebih lanjut. Lesi perdarahan dan nekrosis dianalisis menggunakan histopatologi dengan pewarnaan hematoksilin-eosin (HE). Lesi perdarahan ditandai dengan sel darah merah yang bermigrasi dari pembuluh darah ke dalam jaringan di antara ruang tubular proksimal. Sebaliknya, lesi nekrosis ditandai dengan perubahan bentuk dan inti sel (inti sel lebih gelap), yang mengindikasikan adanya pyknosis. Lesi perdarahan dan nekrosis pada sel ginjal dihitung dan diberi skor seperti yang tercantum pada Tabel 2.

**Tabel 1.** Distribusi Subjek dalam Uji Toksisitas

Kelompok	Dosis
Kontrol	1 ml air suling
P1	Ekstrak <i>Stenochlaena palustris</i> 2.000 mg/kg berat badan (1 ml).
P2	Ekstrak <i>Stenochlaena palustris</i> 2.500 mg/kg berat badan (1 ml).
P3	Ekstrak <i>Stenochlaena palustris</i> 3.000 mg/kg berat badan (1 ml).

**Tabel 2.** Skor Lesi Perdarahan dan Nekrosis

<b>Tampilan Perdarahan</b>	<b>Skor</b>
Tidak ada lesi perdarahan	0
Perdarahan ringan (<25% area)	1
Perdarahan sedang (25–50% area)	2
Perdarahan parah (>50% area)	3

  

<b>Lesi Nekrosis</b>	<b>Skor</b>
Tidak ada lesi nekrosis	0
Nekrosis ringan (<25% area)	1
Nekrosis sedang (25–50% area)	2
Nekrosis parah (>50% area)	3

### Hasil

Analisis histopatologi lesi perdarahan ditandai dengan sel darah merah yang bermigrasi dari pembuluh darah ke dalam jaringan di antara ruang tubulus proksimal (panah hitam). Jaringan ginjal menunjukkan perdarahan intratubular ringan (<25% luas) pada kelompok yang diberi ekstrak *Stenochlaena palustris* dengan dosis 2.500 dan 3.000 mg/kg BB. Jenis lesi perdarahan adalah petekie, berukuran 1-2 mm. Tidak ada perubahan histopatologi pada perdarahan pada kelompok kontrol dan kelompok ekstrak *Stenochlaena palustris* 2.000 mg/kg BB.

Kelompok ekstrak *Stenochlaena palustris* 2.500 dan 3.000 mg/kg berat badan menunjukkan lesi perdarahan yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol dan 2.000 mg/kg berat badan ( $p < 0,05$ ). Tidak ada perbedaan yang signifikan pada lesi perdarahan pada kelompok kontrol dan 2.000 mg/kg BB ekstrak *Stenochlaena palustris* ( $p > 0,05$ ).

Lesi nekrosis pada analisis histopatologi ditandai dengan perubahan bentuk dan inti sel (inti sel lebih gelap) yang mengindikasikan adanya piknosis (panah hitam). Ginjal menunjukkan nekrosis ringan (<25% area) pada kelompok yang diberi ekstrak *Stenochlaena palustris* 2.500 dan 3.000 mg/kg BB ( $p < 0,05$ ). Tidak ada lesi nekrosis yang diamati pada kelompok kontrol dan 2.000 mg/kg/berat badan ekstrak *Stenochlaena palustris*.

### Diskusi

Perubahan histopatologi pada ginjal biasanya disebabkan oleh zat yang masuk ke dalam aliran darah dan bersifat toksik bagi tubuh. Penggunaan bahan alami yang tidak tepat dapat berpotensi menyebabkan kerusakan organ tubuh, seperti ginjal. Hal ini dikarenakan ginjal merupakan organ yang sering mengakumulasi efek yang tidak diinginkan dari penggunaan obat yang dikonsumsi secara oral.<sup>10,11</sup> Berdasarkan hasil uji statistik terhadap gambaran histopatologi perdarahan, didapatkan hasil bahwa pada kelompok perlakuan dosis 2.000 mg/kg BB tidak berbeda bermakna dengan kontrol. Pada kelompok perlakuan dosis 2.500 mg/kg BB dan kelompok perlakuan dosis 3.000 mg/kg BB terdapat perbedaan yang bermakna dengan kelompok kontrol, hal ini menunjukkan bahwa perlakuan tersebut berpotensi toksik terhadap ginjal tikus Wistar.

Pada kelompok kontrol yang diberi akuades, tidak terlihat adanya gambaran histopatologis perdarahan. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian akuades aman bagi ginjal tikus. Menurut penelitian Maliangkay dkk., akuades tidak berpotensi menimbulkan efek toksik karena tidak bersifat iritan. Pemberian ekstrak daun *Stenochlaena palustris* dosis 2.000 mg/kg BB tidak menimbulkan tanda-tanda perdarahan. Pada kelompok P1 yang diberi ekstrak *Stenochlaena palustris* dosis 2.000 mg/kg BB tidak terlihat adanya perdarahan. Hal ini sejalan dengan penelitian Alsawaf *et al.* yang menemukan bahwa penggunaan flavonoid dengan dosis yang tepat tidak akan menimbulkan efek toksik pada ginjal tikus Wistar. Sudira *et al.* menyatakan bahwa keberadaan flavonoid memperkuat pembuluh darah dan menghambat peroksidasi lipid melalui aktivasi peroksidase pada hemoglobin untuk mengantisipasi kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas. Flavonoid dapat mencegah hemolisis sel darah merah yang disebabkan oleh radikal bebas.

Kelompok perlakuan dengan dosis 2.500 mg/kg BB dan kelompok perlakuan dengan dosis 3.000 mg/kg BB memiliki perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol. Pada kedua kelompok tersebut, terdapat gambaran histopatologi perdarahan ringan <25%. Menurut penelitian Rafe dkk., perdarahan tubular yang diakibatkan oleh efek toksik

terjadi pada kelompok perlakuan yang mengkonsumsi ekstrak dengan dosis tinggi. Saponin merupakan salah satu metabolit sekunder yang mempengaruhi terjadinya perdarahan dengan penggunaan ekstrak daun *Stenochlaena palustris*. Saponin bersifat membranolitik yang menyebabkan disintegrasi lapisan endotel kapiler, menyebabkan pendarahan pada ginjal tikus. Saponin melukai lipid bilayer dari membran protein sel darah merah, yang mengakibatkan respon inflamasi. Dua tahap inflamasi adalah tahap vaskular dan tahap akhir. Tahap vaskular dikaitkan dengan vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas kapiler di mana zat-zat darah meninggalkan plasma. Tahap akhir terjadi ketika leukosit menyusup ke dalam jaringan yang meradang. Hal ini menyebabkan pelepasan berbagai mediator seperti histamin, prostaglandin, dan leukotrien yang dihasilkan dari plasma. Prostaglandin memiliki efek vasodilatasi, mengendurkan otot polos, dan meningkatkan permeabilitas kapiler. Histamin berperan dalam perubahan paling awal, menyebabkan vasodilatasi pada arteriolar yang didahului oleh vasokonstriksi awal dan peningkatan permeabilitas kapiler. Hal ini menyebabkan perubahan dalam distribusi sel darah merah, seperti aliran darah yang lambat ketika sel darah merah menggumpal dan akibatnya terdorong ke tepi. Sel darah putih menempel pada dinding pembuluh darah dengan aliran darah yang lebih lambat. Perubahan permeabilitas yang terjadi menyebabkan darah keluar dari pembuluh darah dan terkumpul di jaringan.

Hasil uji statistik terhadap gambaran histopatologi nekrosis menunjukkan bahwa kelompok perlakuan dengan dosis 2.000 mg/kg BB tidak berbeda bermakna dengan kelompok kontrol. Pada kelompok perlakuan dosis 2.500 mg/kg BB dan kelompok perlakuan dosis 3.000 mg/kg BB terdapat perbedaan yang bermakna dengan kelompok kontrol. Menurut penelitian Makiyah dkk.,<sup>15</sup> jika kelompok perlakuan memiliki perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol, maka kelompok tersebut berpotensi toksik terhadap ginjal berdasarkan nekrosis. Pada pengamatan mikroskopis kelompok kontrol yang hanya diberi akuades, tidak terjadi perubahan histopatologi nekrosis karena air bukan merupakan bahan iritan, sehingga tidak berpotensi toksik terhadap organ.

Kelompok P1 yang diberi ekstrak daun *Stenochlaena palustris* dosis 2.000 mg/kgBB tidak menunjukkan adanya gambaran histopatologi nekrosis. Flavonoid dengan dosis yang tepat memiliki potensi antioksidan yang dapat menghambat reaksi oksidasi dengan cara menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan sel. Hal ini disebabkan oleh kandungan metabolit sekunder yang dimiliki oleh ekstrak daun *Stenochlaena palustris*, seperti flavonoid dan fenolat, yang memiliki kemampuan untuk menghambat radikal bebas dan reaksi oksidatif. Sebagai antioksidan, mekanisme kerja langsung dari flavonoid adalah menstabilkan radikal bebas dengan cara melengkapi kekurangan elektron dan menghambat reaksi berantai yang membentuk radikal bebas perusak sel. Mekanisme kerja antioksidan secara tidak langsung adalah penghambatan enzim yang terlibat dalam produksi radikal bebas dengan cara menetralkan dan menekan pembentukan ROS sehingga jumlahnya menurun dan aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD) meningkat. Antioksidan dapat memodulasi reaksi radikal bebas dengan cara mereduksi hiper peroksida lipid dan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), sehingga mencegah terjadinya peroksidasi lipid. SOD berperan dalam mengkatalisis reaksi dismutasi radikal bebas anion superoksida ( $O^-$ ) menjadi hidrogen peroksida dan oksigen, sehingga mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil dan tidak berbahaya bagi sel.

Pada kelompok perlakuan dosis 2.500 mg/kg BB dan dosis 3.000 mg/kg BB menunjukkan gambaran histopatologi nekrosis. Hasil uji statistik menyatakan bahwa kelompok perlakuan dosis 2.500 mg/kg BB dan kelompok perlakuan dosis 3.000 mg/kg BB memiliki perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol sehingga kedua kelompok perlakuan tersebut berpotensi toksik terhadap ginjal tikus. Nekrosis sel epitel tubulus disebabkan oleh asupan metabolit sekunder yang berlebihan yang terkandung dalam ekstrak yang bersifat nefrotoksik. Flavonoid merupakan salah satu kandungan yang berpotensi toksik pada ekstrak daun *Stenochlaena palustris*. Flavonoid dalam konsentrasi tinggi dapat bersifat pro-oksidan. Kuersetin merupakan salah satu senyawa yang dapat bersifat prooksidan di antara senyawa flavonoid tersebut.

Ketika terdapat terlalu banyak radikal bebas, antioksidan endogen akan menghabiskan tingkat penggunaannya dibandingkan dengan tingkat regenerasinya. Ketidakseimbangan antara prooksidan dan antioksidan dalam tubuh akan mengakibatkan peningkatan laju pembentukan radikal bebas, sehingga terjadi peningkatan stres oksidatif yang menyebabkan peroksidasi lipid, DNA teroksidasi, dan protein terlipat. Hal ini mengakibatkan akumulasi ikatan kovalen pada membran tubulus dengan radikal bebas, yang mengakibatkan kerusakan pada tubulus ginjal. Prooksidan menyebabkan stres oksidatif dan disfungsi mitokondria. Disfungsi mitokondria adalah suatu kondisi yang ditandai dengan gangguan biogenesis mitokondria, perubahan potensial membran, berkurangnya jumlah mitokondria, dan perubahan aktivitas oksidatif protein akibat akumulasi ROS dalam sel dan jaringan. Disfungsi mitokondria menyebabkan degenerasi hidropik karena gangguan transportasi aktif. Proses osmosis yang terganggu menyebabkan air masuk ke dalam sel sehingga sel membengkak dengan vakuola, dan inti sel membesar. Sel yang mengalami degenerasi hidropik dan terus menerus terpapar senyawa toksik akan menjadi nekrotik.

Dapat disimpulkan bahwa tidak ada efek toksik pada pemberian dosis ekstrak daun *Stenochlaena palustris* sebesar 2.000 mg/kg berat badan terhadap ginjal tikus Wistar berdasarkan tampilan histopatologi perdarahan dan nekrosis. Namun, terdapat efek toksik pada pemberian ekstrak daun *Stenochlaena palustris* dengan dosis 2.500 mg/kg dan 3.000 mg/kg berat badan terhadap ginjal tikus Wistar berdasarkan tampilan histopatologi perdarahan dan nekrosis.





## Bab 4

### Khasiat Ekstrak Terung Belanda dalam Terapi Kanker Lidah

#### A. Efek Ekstrak Kulit Buah Terung Belanda terhadap Sel Kanker Lidah HSC-3

---

Kanker mulut adalah salah satu penyebab kematian utama di dunia. Menurut GLOBOCAN 2018, International Agency for Research on Cancer (IARC) mengungkapkan bahwa terdapat 18,1 juta kasus baru dan 9,6 juta kasus kematian akibat kanker di dunia. Kanker mulut menempati tingkat ketujuh dengan insiden 572.000 kasus baru dengan 509.000 kasus kematian. Kanker mulut juga merupakan salah satu kasus keganasan yang umum terjadi di negara berkembang. Di Indonesia, kasus kanker kepala dan leher sekitar 3-4% dari semua kanker dengan tingkat kematian sekitar 2-3%.

Kanker mulut adalah subtype dari kanker kepala dan leher yang terjadi dalam rongga mulut. Ada beberapa jenis kanker mulut dengan 90% sebagai karsinoma sel skuamosa. Karsinoma sel skuamosa adalah neoplasma ganas yang berasal dari sel skuamosa berlapis yang umumnya terjadi pada bibir, lidah, dan dasar mulut. Terlepas dari meningkatnya metode terapi, tingkat morbiditas dan mortalitas karsinoma sel skuamosa tidak mengalami penurunan yang signifikan selama 30 tahun terakhir ini.

Terapi karsinoma sel skuamosa terdiri dari pembedahan, radio dan kemoterapi. Namun, jenis pengobatan ini memiliki beberapa efek samping seperti rasa sakit dan kekeringan rongga mulut, kesulitan dalam berbicara, makan, menelan dan hilangnya fungsi pengecap, masalah proses metabolisme manusia. Oleh karena itu banyak penelitian telah dilakukan untuk mendukung pengobatan alternatif yang salah satunya dengan menggunakan produk herbal alami. Produk alami memiliki efek samping yang lebih rendah dibandingkan terapi konvensional termasuk pembedahan, radio, dan kemoterapi karena toksisitas yang lebih rendah terhadap sel normal.

Sejak beberapa tahun lalu, produk herbal alami telah digunakan sebagai pendahulu obat modern untuk mengobati berbagai penyakit. Negara berkembang termasuk Indonesia banyak mengkonsumsi obat herbal alami karena harganya yang terjangkau. Di Indonesia, terdapat sekitar 30.000 tanaman herbal yang berpotensi sebagai obat dan sebanyak 7.500 telah diterima dan dinyatakan sebagai obat herbal. Banyak penelitian telah dikembangkan untuk mencari potensi produk herbal alami untuk mengobati penyakit seperti kanker.

Sekitar 54% obat antikanker yang telah diterima dalam periode 1940-2002 berasal dari produk alami. Beberapa metabolit herbal memiliki potensi antioksidan yang kuat melawan radikal bebas dan menurunkan ketidakseimbangan redoks. Beberapa obat herbal juga memiliki komponen bioaktif untuk mencegah terjadinya proses karsinogenesis fase inisiasi. Salah satu tanaman herbal yang memiliki potensi anti-kanker adalah terung Belanda (*Cyphomandra betacea* Sendtn.).

Terung Belanda, yang sering disebut sebagai tamarillo dinyatakan kaya akan kapasitas antioksidan alami karena kandungan vitamin A, B6, C, E, dan senyawa polifenol. Penelitian sebelumnya telah menyebutkan bahwa kulit buah terung Belanda memiliki senyawa antioksidan aktif yang lebih tinggi dibandingkan dengan bagian lainnya. Terung Belanda memiliki potensi anti-kanker sebagai antioksidan dan aktivitas anti-proliferasi sel kanker hati (HepG2) dan kelenjar mammae (MDA-MB-231)

tanpa menghambat proliferasi sel normal fibroblast tikus (3T3). Namun, hingga saat ini, belum ada penelitian tentang kulit buah terung Belanda pada sel karsinoma sel skuamosa lidah (HSC-3). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh kulit buah terung Belanda terhadap viabilitas sel HSC-3.

### **Bahan dan Metode**

Penelitian ini dilakukan pada September 2019 – November 2019 di Pusat Penelitian Biologi LIPI untuk uji determinasi tanaman dan di Laboratorium Terpadu Universitas Yarsi untuk proses ekstraksi, kandungan fitokimia, dan uji viabilitas. Penelitian ini merupakan eksperimental laboratorik *in vitro*. Bahan yang digunakan adalah ekstrak etanol 70% kulit buah terung Belanda (*Cyphomandra betacea* Sendtn.) berwarna merah oranye. Sampel penelitian adalah sel HSC-3 dari Biobank Laboratorium Terpadu Universitas Yarsi. Kelompok sampel terdiri dari kelompok perlakuan, positif ( $H_2O_2$  3%) dan negatif. Kelompok perlakuan terdiri dari beberapa kelompok konsentrasi yaitu 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1,25%, dan 0,3125%.

Ekstrak kulit buah terung Belanda yang telah dikeringkan di bawah sinar matahari dilakukan dengan teknik maserasi menggunakan etanol 70% selama 72 jam. Kemudian disaring dan diuapkan untuk mendapatkan ekstrak kasar. Ekstrak diencerkan untuk mempersiapkan beberapa konsentrasi 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1,25%, dan 0,6125%. Studi fitokimia dilakukan pada ekstrak.

### **Media kultur menggunakan Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)**

10% Fetal Bovine Serum (FBS) dan 1% antibiotik (Penisilin-Streptomisin) dan antimikotik (Amfoterisin B). Kultur ekspansi dan inkubasi dilakukan selama 24 jam. Sel dikumpulkan setelah 1 minggu kultur dan kemudian dikultur selama 24 jam pada 6 well plate dengan masing-masing 15.000 sel. Masukkan reagen Cell Counting Kit-8 (CCK-8) ke dalam well. Setelah 1 jam, uji viabilitas sel dapat dilakukan melalui microplate reader dengan panjang gelombang 450 nm.

## Hasil

Berdasarkan uji determinasi oleh Pusat Penelitian Biologi–Lembaga Ilmu Pengetahuan (LIPI), buah yang digunakan dalam penelitian ini adalah dari spesies *Solanum betaceum* Cav. atau disebut *Cyphomandra betacea* Sendtn. Uji fitokimia ekstrak menunjukkan kandungan fenol, flavonoid, tanin dan alkaloid yang ditunjukkan pada Tabel 1. Hasil uji viabilitas ekstrak pada sel HSC-3 ditunjukkan pada Tabel 2.

Paparan konsentrasi ekstrak 20%, 10%, 5% pada sel HSC-3 menunjukkan penurunan nilai absorbansi sedangkan peningkatan absorbansi ditunjukkan pada paparan ekstrak konsentrasi 2,5%, 1,25%, 0,625% dan 0,3125%. Analisis pengaruh ekstrak biji Terung Belanda (*Cyphomandra Betacea* Sendtn.) terhadap viabilitas sel HSC-3 pada Tabel 3 menunjukkan distribusi normal dengan  $p > 0,05$ . Uji one-way Anova menunjukkan perbedaan signifikan antar kelompok konsentrasi ekstrak biji Terung Belanda (*Cyphomandra Betacea* Sendtn.) dengan  $p < 0,05$ . Uji post hoc LSD menunjukkan ada perbedaan signifikan antar konsentrasi ekstrak kecuali dari konsentrasi 20%, 10%, 5%. Terdapat juga perbedaan signifikan antara kelompok kontrol dan konsentrasi ekstrak kecuali untuk konsentrasi 5% dengan kontrol positif dan konsentrasi 1,25%; 0,3125%; 0,625% dengan kelompok kontrol negatif. (Tabel 4)

**Tabel 1.** Hasil uji fitokimia *Cyphomandra Betacea* Sendt.

No.	Secondary metabolite	Method of test	Result
1.	Phenolic	Reagent FeCl <sub>3</sub> 5%	+
2.	Flavonoid	a. reagent HCl pekat+ Mg	+
		b. reagent H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2N	+
		c. reagent NaOH 10%	+
3.	Steroid	Reagent Lieberman-Burchard	-
4.	Triterpenoid	Reagent Lieberman Burchard	-
5.	Saponin	Reagent HCl + H <sub>2</sub> O	-
6.	Tannin	Reagent FeCl <sub>3</sub> 1%	+
7.	Alkaloid	a. Reagent Hager	+
		b. Reagent Wagner	+
		c. Reagent Dragendorff	+
		d. Reagent Mayer	+

**Tabel 2.** Uji viabilitas ekstrak biji terung Belanda (*Cyphomandra Betacea Sendtn.*) terhadap sel HSC-3 setelah inkubasi 24 jam.

Material tested	N	X ± SD*
Negative control (-)	3	0.112 ± 0.003
Positive control (+) with H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%	3	0.018 ± 0.002
Extract (20%)	3	0.035 ± 0.004
Extract (10%)	3	0.032 ± 0.004
Extract (5%)	3	0.025 ± 0.003
Extract (2.5%)	3	0.057 ± 0.012
Extract (1.25%)	3	0.103 ± 0.012
Extract (0.625%)	3	0.122 ± 0.006
Extract (0.3125%)	3	0.121 ± 0.005

Catatan: \*rata-rata dari 3x pengukuran (mg/mL).

Tested groups		Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.
<i>Cyphomandra betacea</i> , Sendtn pill fruit extract	20%	0,842	3	0,220
	10%	0,987	3	0,780
	5%	0,855	3	0,253
	2,5%	0,778	3	0,062
	1,25%	0,842	3	0,220
	0,625%	0,999	3	0,927
	0,3125%	0,881	3	0,328
Control	Negative	0,993	3	0,843
	Positive	0,987	3	0,780

**Tabel 4.** Uji Anova satu arah data viabilitas sel HSC-3.

Viability	Sum of quadrat	df	Mean	F	Sig.
Among groups	0,056	9	0,006	106,722	0,000
Within group	0,001	20	0,000		
Total	0,057	29			

## Diskusi

Kandungan fitokimia kulit buah terung Belanda adalah senyawa polifenol seperti asam fenolat dan flavonoid. Senyawa polifenol diduga memiliki efek antikanker yang menghambat siklus sel pada fase G1/S dan G2/M dan menginduksi proses apoptosis. Dalam penelitian ini, aktivitas antikanker

kulit buah terung Belanda diuji pada viabilitas sel HSC-3. Uji viabilitas ini dilakukan untuk mengetahui sel yang viable setelah paparan agen uji.

Penelitian ini menggunakan metode kolorimetri CCK-8 menggunakan reagen tetrazolium salt WST-8 yang menghasilkan warna oranye formazan saat berkontak dengan sel viable. Dalam penelitian ini, terjadi penurunan nilai absorbansi pada beberapa kelompok konsentrasi ekstrak (20%, 10%, dan 5%). Penurunan nilai yang lebih tinggi mengikuti konsentrasi ekstrak yang lebih rendah. Kandungan senyawa polifenol ekstrak yang lebih tinggi cenderung meningkatkan potensi mutagen dalam sel karena kandungan quercetin yang cukup tinggi dalam flavonoid yang meningkatkan produksi reactive oxygen species untuk mendorong mutasi DNA.

Reactive oxygen species akan menyerang makromolekul seperti protein, lemak, dan asam nukleat sehingga perubahan makromolekul mengakibatkan mutasi DNA dan aktivitas proliferasi progresif sel mutagenik. Di sisi lain, uji viabilitas dalam beberapa kelompok ekstraksi (2,5%, 1,25%, 0,625% dan 0,3125%) menunjukkan peningkatan nilai absorbansi. Hal ini menunjukkan bahwa penurunan kandungan senyawa polifenol dalam ekstrak memiliki efek sitotoksik yang lebih rendah.

Konsentrasi 5% ekstrak menunjukkan potensi tertinggi terhadap viabilitas sel HSC-3 dibandingkan konsentrasi lainnya. Ada juga ditunjukkan bahwa dengan post hoc LSD tidak ada perbedaan signifikan antara konsentrasi ekstrak 5% dengan kelompok kontrol positif  $H_2O_2$  3%. Hasil ini menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak 5% adalah konsentrasi efektif untuk mengurangi viabilitas sel HSC-3.

Hasil ini mendukung penelitian sebelumnya bahwa ekstrak etanol terung Belanda sebagai sifat antikanker melalui aktivitas antioksidan dan anti-proliferasi pada Sel Kanker Hati (HepG2) dan kanker adeno mamae (MDA-MB-231) yang tidak menunjukkan efek toksik pada sel fibroblast normal. Penelitian sebelumnya mengungkapkan bahwa kandungan senyawa polifenol terung Belanda, dalam bentuk asam fenolat dan flavonoid diduga memiliki potensi antikanker.

## Kesimpulan

Di antara konsentrasi ekstrak etanol 70% terung Belanda (*Cyphomandra betacea* Sendtn.), konsentrasi 5% merupakan konsentrasi efektif untuk menurunkan viabilitas sel HSC-3 (Human Oral Squamous Carcinoma). Tidak ada perbedaan signifikan dari konsentrasi ini dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% sebagai kontrol positif.

## B. Efek Ekstrak Kulit Manggis dalam Menghambat Pertumbuhan Sel Kanker Lidah

Tingginya angka kejadian kanker lidah yang disertai dengan tingkat kematian yang tinggi, terutama di negara berkembang seperti Indonesia, merupakan masalah yang perlu diatasi. Berbagai metode terapi, termasuk operasi, radiasi, kemoterapi, dan/atau kombinasi dari semuanya, telah diterapkan untuk mengobati kanker lidah manusia. Namun, kejadian kanker lidah belum menunjukkan penurunan yang signifikan. Dalam empat dekade terakhir, eksplorasi obat herbal anti-kanker semakin giat dilakukan dengan harapan bahwa obat herbal memiliki efektivitas yang lebih baik dengan efek samping yang lebih rendah.

Ekstrak etanol kulit manggis adalah salah satu bahan herbal yang dipelajari dan diyakini memiliki khasiat sebagai anti-inflamasi, antioksidan, antiproliferasi, serta mampu menginduksi apoptosis. Penelitian mengenai aktivitas anti-kanker yang dilakukan oleh Elya dan Matsumoto *et al.* menunjukkan bahwa enam jenis xanton ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  mangostin, mangostinone, E garcinone, dan 2-isoprenyl-1,7-dihidroksi-3-metoksi xanton) yang diekstrak dari kulit manggis memiliki potensi untuk menghambat proliferasi sel kanker sekaligus meningkatkan proses apoptosis sel kanker.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa proliferasi sel kanker payudara dihambat oleh ekstrak kulit manggis, dan penghambatan tersebut bergantung pada konsentrasi. Ekstrak kulit manggis dengan konsentrasi 6,25-25  $\mu\text{g/ml}$  efektif untuk menghambat proliferasi sel. Oleh karena itu, kulit manggis telah terbukti sebagai penghambat proliferasi sel yang kuat terhadap aktivitas kanker payudara dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar  $9,25 \pm 0,64$

µg/ml. Hal terpenting dari temuan efek terapeutik ekstrak kulit manggis yang diekstraksi dengan etanol sebagai pelarutnya adalah ditemukannya bahan herbal sebagai penghambat proliferasi sel kanker, termasuk sel kanker lidah manusia Supri's Clone 1 (SP-C1).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: serum janin sapi/FBS (Gibco, Australia), cairan Fungizone (Hyclone, Jepang), penisilin-streptomisin, ekstrak etanol kulit manggis (Tasikmalaya, Indonesia), Trypsin-EDTA (Gibco, Australia), larutan MTT (Sigma Aldrich, AS), isopropanol, alkohol 70%, PBS, dan RPMI 1640.

Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: Bio Rad microplate reader (Bio Rad, USA), mikropipet 96 sumur (Iwaki, Jepang), adjustable volume digital pipet (Eppendorf, Jerman), tabung konikal 15 ml dan 50 ml (Iwaki, Jepang), shaker (Lab Line, Jepang), waterbath (Eyela, Jepang), tabung mini Eppendorf (Iwaki, Jepang), inkubator pada suhu 37 °C dengan CO<sub>2</sub> 5% (Sanyo, Jepang), kulkas pada suhu 4 °C, -20 °C, dan -30 °C (Sanyo, Jepang), timbangan digital elektronik (Melter, Swiss), filter (Corning, Jerman), syringe 10 ml (Terumo, Filipina), vortex (Maxi mix II, USA), clean bench (Sanyo, Jepang), lampu spiritus metil, flash (Iwaki, Jepang), cawan petri (Iwaki, Jepang), mikroskop (Nikon, Jepang), suction (Assamica, Jepang), dan haemocitometer (Assistant, Jerman). Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Riset Terpadu Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada dari April 2010 hingga Oktober 2010, menggunakan sel kanker lidah Supri's Clone 1 (SP-C1).

## Metode

Penilaian penghambatan sel kanker lidah Supri's Clone 1 dilakukan secara *in vitro* menggunakan mikropipet 96 sumur. Penelitian ini menghitung rata-rata proliferasi sel kanker SP-C1 yang masih hidup setelah diinkubasi dengan berbagai konsentrasi ekstrak etanol kulit manggis, dengan dua kelompok waktu inkubasi yang digunakan, yaitu 24 jam dan 48 jam. Hasil pengukuran dilakukan menggunakan pembaca mikropipet Bio Rad pada panjang gelombang 450 nm.

Ekstrak etanol kulit manggis dibagi menjadi enam kelompok uji berdasarkan konsentrasinya: kelompok pertama adalah kontrol dengan konsentrasi 0 (nol) ekstrak etanol kulit manggis; kelompok kedua menggunakan konsentrasi 62,50 µg/ml; kelompok ketiga menggunakan konsentrasi 125 µg/ml; kelompok keempat menggunakan konsentrasi 250 µg/ml; kelompok kelima menggunakan konsentrasi 500 µg/ml; dan kelompok keenam menggunakan konsentrasi 1000 µg/ml.

Rata-rata proliferasi sel kanker SP-C1 dihitung menggunakan pembaca mikropipet Bio Rad, dan persentase viabilitas sel ditentukan berdasarkan hasil pengukuran dari kultur sel kanker Supri's Clone 1 (SP-C1) yang ditambahkan dengan berbagai konsentrasi ekstrak etanol kulit manggis. Hasil penelitian kemudian dianalisis secara statistik dengan ANOVA, dan jika ANOVA menunjukkan signifikansi, uji Newman-Keuls dilakukan untuk analisis lebih lanjut.

## Hasil

Ekstrak etanol dari kulit manggis dapat menghambat pertumbuhan sel kanker lidah SP-C1 mulai dari konsentrasi terendah, yaitu 62,5 µg/mL. Konsentrasi 0 (nol) merupakan kontrol dan menunjukkan rata-rata pertumbuhan sel 100%. Pengurangan rata-rata pertumbuhan sel kanker lidah terjadi mulai dari konsentrasi ekstrak etanol kulit manggis 62,5 µg/mL (rata-rata pertumbuhan sel 72,3%). Pada konsentrasi 125 µg/mL (median 72 sel pasca-partum, 15%) terjadi sedikit peningkatan, tetapi pada konsentrasi 250 µg/mL (rata-rata pertumbuhan sel 64,93%) penurunan semakin besar, dan puncak penurunan maksimal terjadi pada konsentrasi 500 µg/mL (median 49 sel pasca-partum, 66%), sedangkan pada konsentrasi 1000 µg/mL (rata-rata pertumbuhan sel 53,69%) terjadi penurunan rata-rata pertumbuhan sel yang lebih kecil dibandingkan dengan konsentrasi 500 µg/mL.

Rata-rata pertumbuhan sel kanker lidah setelah diinkubasi dengan ekstrak etanol kulit manggis selama 48 jam. Rata-rata pertumbuhan sel kanker lidah pada konsentrasi nol setelah inkubasi 48 jam adalah 100%

dan digunakan sebagai kontrol. Pengurangan rata-rata pertumbuhan sel dimulai pada konsentrasi 62,5 µg/mL (rata-rata pertumbuhan sel adalah 74,18%) dan terus menurun seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak etanol kulit manggis. Puncak penurunan terjadi pada konsentrasi 500 µg/mL (rata-rata pertumbuhan sel 52,34%) sementara pada konsentrasi 1000 µg/mL (rata-rata pertumbuhan sel 58,52%) terjadi sedikit peningkatan rata-rata pertumbuhan sel dibandingkan dengan konsentrasi 500 µg/mL.

Perbandingan sel kanker lidah SP-C1 antara inkubasi 24 jam dan inkubasi 48 jam dengan berbagai konsentrasi ekstrak etanol kulit manggis. Rata-rata proliferasi sel kanker pada kedua waktu inkubasi mulai menurun pada konsentrasi 62,5 µg/ml, dan terus menurun seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak etanol kulit manggis. Puncak rata-rata proliferasi sel tercapai pada konsentrasi 500 µg/ml dengan inkubasi 24 jam sebesar 49,66%, dan sebesar 52,34% pada periode inkubasi 48 jam. Oleh karena itu, konsentrasi 500 µg/ml ekstrak etanol kulit manggis lebih efektif untuk menghambat rata-rata proliferasi sel. Periode inkubasi 24 jam untuk konsentrasi ekstrak etanol kulit manggis 500 µg/ml memiliki skor penghambatan proliferasi sel yang paling efektif sebesar 50,30%. Rata-rata proliferasi sel meningkat pada konsentrasi 1000 µg/ml baik pada periode inkubasi 24 jam (rata-rata proliferasi sel 53,69%) maupun periode inkubasi 48 jam (rata-rata proliferasi sel 58,52%).

Pengaruh ekstrak etanol kulit manggis terhadap penurunan rata-rata pertumbuhan sel kanker serta penghambatan proliferasi sel kanker lidah manusia dengan periode inkubasi 24 jam dan 48 jam. Penurunan rata-rata pertumbuhan sel kanker yang paling efektif dan penghambatan maksimum proliferasi sel terjadi pada konsentrasi 500 µg/ml baik pada periode inkubasi 24 jam maupun 48 jam.

## **Pembahasan**

Telah dilakukan beberapa penelitian untuk menganalisis efek antikanker dari Xanton yang diisolasi dari kulit manggis (*Garcinia mangostana* Linn.), termasuk pengaruhnya terhadap sel hepatoseluler, sel kanker payudara

manusia SKBR3, dan sel leukemia manusia. Ho *et al.* mempelajari efek sitotoksitas dari enam jenis Xanton yang diisolasi dari kulit manggis dan menemukan bahwa E garcinone memiliki efek sitotoksitas terhadap garis sel kanker hati. Sementara itu, Matsumoto *et al.* meneliti efek dari enam Xanton ( $\alpha$ ,  $\beta$ , dan  $\gamma$  mangostin, mangostinon, garcinon E, serta 2-isoprenil-1,7-dihidroksi-3-metoksi Xanton) terhadap penghambatan sel leukemik HL60. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semua jenis Xanton memiliki aksi penghambatan yang signifikan, terutama  $\alpha$ ,  $\beta$ , dan  $\gamma$  mangostin.

Moongkarndi *et al.* mengevaluasi aksi penghambatan proliferasi sel, induksi apoptosis, serta aktivitas antioksidan dari ekstrak metanol kulit manggis menggunakan garis sel kanker payudara SKBR3. Hasilnya menunjukkan bahwa kulit manggis memiliki efek penghambatan proliferasi sel yang paling signifikan ( $ED_{50} = 9,25 \pm 0,64 \mu\text{g/ml}$ ) dan mampu menginduksi proses apoptosis.

Suksamrarn *et al.* mengisolasi tiga Xanton baru dari kulit manggis, yaitu mangostenon C, D, dan E, yang memiliki manfaat setara dengan 16 Xanton lainnya yang telah dikenal. Efek sitotoksitas dari ketiga Xanton ini diuji pada tiga garis sel kanker yang berbeda: karsinoma epidermoid oral (KB), kanker payudara (SM-1), dan garis sel kanker paru-paru (NCI-H187). Mangostenon C menunjukkan efek sitotoksik terhadap ketiga garis sel tersebut dengan nilai  $IC_{50}$  masing-masing sebesar 2,8, 3,53, dan 3,72  $\mu\text{g/ml}$ . Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa  $\alpha$ -mangostin memiliki efek sitotoksik pada sel karsinoma epidermoid oral (KB) dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 2,08  $\mu\text{g/ml}$ .

Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit manggis memiliki efek penghambatan minimal ( $IC_{50}$ ) dalam menghambat proliferasi sel kanker lidah Supri's Clone 1 (SP-C1). Grafik pertama menunjukkan rata-rata pertumbuhan sel kanker lidah manusia SP-C1 setelah diinkubasi dengan berbagai konsentrasi ekstrak etanol kulit manggis (0/ kontrol, 62,5  $\mu\text{g/ml}$ , 125  $\mu\text{g/ml}$ , 250  $\mu\text{g/ml}$ , 500  $\mu\text{g/ml}$ , dan 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) selama 24 jam. Konsentrasi kontrol dianggap memiliki laju pertumbuhan sel rata-rata

sebesar 100%. Konsentrasi 62,5 µg/ml menunjukkan efek penurunan pada rata-rata pertumbuhan sel, dengan nilai proliferasi sel rata-rata sebesar 72,3%. Ini menunjukkan bahwa aksi penghambatan sel kanker lidah SP-C1 setelah periode inkubasi 24 jam memiliki nilai penghambatan sebesar 27,68%. Pada konsentrasi 125 µg/ml, rata-rata pertumbuhan sel menurun sebesar 72,15% dengan nilai penghambatan sebesar 27,85%. Konsentrasi 250 µg/ml menunjukkan pengurangan pertumbuhan sel yang lebih besar, yaitu sebesar 64,93%, yang berarti nilai penghambatan yang lebih besar, yaitu 35,07%. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol kulit manggis, semakin besar nilai penghambatan pertumbuhan sel kanker lidah yang dihasilkan.

Pada konsentrasi 500 µg/ml, rata-rata pertumbuhan sel menurun secara maksimal dengan laju 49,66%, dan penghambatan pertumbuhan sel menunjukkan nilai sebesar 50,3%. Ini berarti bahwa pada konsentrasi 500 µg/ml dengan periode inkubasi 24 jam, ekstrak etanol kulit manggis mencapai  $IC_{50}$  dengan nilai penghambatan pertumbuhan sel sebesar 50,3%. Pada konsentrasi 1000 µg/ml, meskipun nilai rata-rata pertumbuhan sel juga menurun, tetapi nilainya lebih rendah dibandingkan dengan nilai pada konsentrasi 500 µg/ml, yaitu sebesar 53,69%, dan nilai penghambatan pertumbuhannya adalah 46,3%. Dari hasil ini, dapat disimpulkan bahwa pada konsentrasi 500 µg/ml, penghambatan mencapai puncaknya yang efektif, sementara pada konsentrasi yang lebih tinggi, yaitu 1000 µg/ml, reseptor sel kanker SP-C1 mulai jenuh. Oleh karena itu, reseptor tersebut tidak dapat menangkap molekul aktif dalam ekstrak etanol kulit manggis. Selain itu, pada konsentrasi ekstrak etanol kulit manggis yang lebih tinggi, terjadi benturan antara molekul senyawa aktif yang lebih banyak, yang diharapkan dapat merangsang pertumbuhan sel.

Proliferasi sel adalah proses peningkatan jumlah sel yang melibatkan siklus sel. Siklus sel normal diatur secara ketat oleh Cyclin, Cyclin Dependent Kinase (CDK), dan Cyclin Dependent Kinase Inhibitor (CKI) yang bekerja sama secara terus-menerus dan saling bertanggung jawab

dalam mengontrol berbagai fase mekanisme pengendalian siklus sel di titik pemeriksaan.

Pada sel kanker, kerusakan terjadi pada mekanisme pengatur dasar perilaku sel, sehingga kontrol pertumbuhan sel normal terganggu, yang mengakibatkan pertumbuhan sel yang tidak terkendali. Ekstrak etanol kulit manggis berfungsi sebagai penghambat pertumbuhan sel kanker lidah SP-C1 dengan menciptakan intervensi dalam siklus sel.

Hasil penelitian sebelumnya melaporkan bahwa penghambatan siklus sel yang ditunjukkan oleh  $\alpha$ -mangostin dan  $\beta$ -mangostin menghambat fase G1, sementara fase S dihambat oleh  $\gamma$ -mangostin. Ini terkait dengan modifikasi ekspresi Cyclin, CDK2, dan p27 pada sel kanker usus besar manusia DLD-1. Selain itu,  $\alpha$ -mangostin meningkatkan kadar mikroRNA-143 yang secara negatif mengatur Erk5 pada fase translasi, serta meningkatkan aktivitas penghambatan saat terapi tambahan menggunakan 5-fluorouracil.

Penghambatan pertumbuhan sel kanker lidah SP-C1 oleh ekstrak etanol kulit manggis terjadi antara fase G1 ke S dan antara fase S ke G2, dengan cara menghambat sinyal dari cMyc sehingga sintesis antara Cyclin D dan CDK4/6 terjadi. Hal ini mengarah pada fosforilasi protein Rb yang mengikat dengan E2F, sehingga E2F terpisah dan dapat mengaktifkan awal siklus sel pada fase G1 untuk melewati titik pembatas dan memulai proses proliferasi sel.

Penghambatan pertumbuhan sel juga terjadi pada fase S dengan menghambat sinyal dari cMyc dalam sintesis antara Cyclin E dan CDK2, yang mengakibatkan fosforilasi protein pengikat Rb dan E2F. Fosforilasi ini menghasilkan pemisahan antara Rb dan E2F, yang memicu aktivasi siklus sel untuk melanjutkan ke fase berikutnya. Dengan demikian, ekstrak etanol kulit manggis berperan dalam menghambat sinyal antara cMyc dan Cyclin D dengan CDK4/6, serta antara Cyclin E dan CDK2. Hal ini mencegah sinyal pertumbuhan menyebabkan fosforilasi protein Rb dan pengikatan E2F, sehingga siklus sel tidak dapat diaktifkan.

## **Kesimpulan**

Ekstrak etanol kulit manggis mencapai penghambatan minimum ( $IC_{50}$ ) dalam menghambat proliferasi sel kanker lidah manusia Supri's Clone 1 (SP-C1) secara *in vitro* dengan nilai penghambatan sebesar 50,3% pada konsentrasi 500  $\mu\text{g/ml}$ . Penghambatan minimum proliferasi sel kanker ( $IC_{50}$ ) dari ekstrak etanol kulit manggis tercapai dalam periode inkubasi 24 jam.



## Bab 5

### Kulit Manggis Sebagai Agen Antikanker Lidah

#### A. Efek Ekstrak Etanol Kulit Manggis terhadap Apoptosis Sel Kanker Lidah Klon Supri-1, *in vitro*.

Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) memperkirakan bahwa jumlah pasien kanker di dunia meningkat menjadi 6,25 juta orang setiap tahun. Dalam sepuluh tahun mendatang, diperkirakan 9 juta orang di seluruh dunia akan meninggal karena kanker setiap tahunnya. Dua pertiga pasien kanker di dunia berada di negara berkembang. Di Indonesia, diperkirakan akan ada 100 pasien kanker baru setiap tahun dari 100.000 penduduk. Kematian akibat kanker meningkat setiap tahun dengan kejadian kanker kepala dan leher sekitar 3% dari semua kanker dalam tubuh manusia. Kanker rongga mulut sekitar 30% dari semua kanker kepala dan leher. Lebih dari 90% kanker rongga mulut dan faring berasal dari sel skuamosa. Salah satu kanker di rongga mulut adalah kanker lidah dengan kejadian 1% dari semua kanker dalam tubuh manusia, sedangkan kejadian kanker lidah pada anak sekitar 1-6%.

Kanker adalah penyakit yang ditandai dengan pertumbuhan sel jaringan yang tidak terkendali, kerusakan pada jaringan sekitar, dan kemudian menyebar ke bagian lain melalui pembuluh darah atau

pembuluh getah bening. Meskipun kejadian kanker lidah pada anak-anak kecil, tetap saja ini adalah penyakit yang mematikan. Pengobatan intensif diperlukan untuk mengobati kanker lidah pada anak-anak dan dapat meningkatkan kemungkinan penyembuhan.

Terapi kanker lidah terdiri dari operasi, radioterapi dan kemoterapi. Radioterapi adalah pengobatan yang paling menyakitkan bagi anak-anak, namun merupakan terapi yang paling efektif, dan membutuhkan waktu yang lama hingga seluruh rangkaian radiasi selesai. Kombinasi dengan kemoterapi sering dapat mengurangi keluhan ini. Umumnya, terapi akan mengurangi kekebalan tubuh pasien dan memiliki banyak efek samping. Untuk mengurangi efek samping tersebut dan juga meningkatkan efektivitasnya, diberikan adjuvan pada terapi kanker. Terapi kanker dikombinasikan dengan terapi adjuvan untuk memperkuat efek obat anti-kanker.

Pencegahan kemo menggunakan obat-obatan konvensional kini beralih ke penggunaan bahan alami (herbal). Salah satu bahan alami yang digunakan adalah manggis karena kemampuannya menginduksi apoptosis. Manggis (*Garcinia mangostana* Linn.) mengandung senyawa aktif seperti  $\alpha$ -mangostin,  $\beta$ -mangostin,  $\gamma$ -mangostin, mangostinone, garcinone E dan 2-Isoprenyl-1,7-dihidroksi-3-metoksi-xanton. Apoptosis disebabkan oleh adanya sinyal untuk memulai serangkaian program (kaskade) yang diinduksi pada tingkat molekuler yang melibatkan aktivasi sistein aspartat protease (caspase). Ada dua jalur utama dalam apoptosis, jalur reseptor (ekstrinsik) dan jalur mitokondrial (intrinsik).

Hasil penelitian Akao dkk. menunjukkan bahwa senyawa aktif dalam kulit manggis dapat menginduksi apoptosis melalui jalur intrinsik. Mekanisme senyawa aktif tersebut akan menghambat Akt yang berkontribusi pada penghambatan proliferasi sel dan menginduksi apoptosis serta menjadi protein yang difosforilasi oleh PI-3 kinase. Alfa-mangostin memodulasi sinyal dari Akt yang menyebabkan penghambatan proliferasi sel dan induksi apoptosis. Penghambatan Akt akan memperbaiki mekanisme regulasi apoptosis sehingga dapat berlangsung dengan

mengaktifkan caspase-9. Manfaat kulit manggis telah ditunjukkan dalam hasil penelitian Suanto yang menyatakan bahwa ekstrak etanol memiliki daya hambat pada sel kanker lidah Supri's Clone-1 (SP-C1) pada konsentrasi ekstrak etanol kulit manggis 500 µg/ml setelah inkubasi dan pengamatan 24 jam mencapai IC.

Keseimbangan antara apoptosis dan proliferasi sel merupakan faktor penting dalam homeostasis jaringan. Apoptosis juga dikenal sebagai kematian sel terprogram. Ini adalah proses penting dalam mengatur perkembangan sel homeostasis normal. Proses ini menghasilkan keseimbangan dalam jumlah sel jaringan tertentu melalui eliminasi sel yang rusak dan proliferasi fisiologis. Pertumbuhan kelompok sel, termasuk sel kanker ditentukan oleh keseimbangan proliferasi dan apoptosis. Apoptosis berfungsi untuk menjaga fungsi jaringan menjadi normal dan adanya deregulasi apoptosis mengakibatkan kondisi patologis. Berdasarkan hal ini, penelitian dilakukan untuk mengetahui adanya pengaruh ekstrak etanol kulit manggis terhadap apoptosis sel kanker lidah Supri's Clone-1 (SP-C1) secara *in vitro*.

## **Metode**

Jenis penelitian adalah eksperimental laboratorium dengan menguji pengaruh ekstrak etanol kulit manggis (*Garcinia Mangostana Linn.*) terhadap apoptosis sel kanker lidah Supri's Clone 1 (SP-C1) menggunakan uji pewarnaan akridin oranye dan etidium bromida yang terdiri dari 15 mg akridin oranye dan 50 mg etidium bromida yang dilarutkan dalam 1 ml etanol 95%, kemudian ditambahkan aquades. Subjek penelitian adalah ekstrak etanol kulit manggis (*Garcinia Mangostana Linn.*) dengan berbagai konsentrasi; 0 (tanpa ekstrak etanol kulit manggis sebagai kontrol), 300, 400, 500, 600, dan 700 µg/ml.

Prosedur penelitian adalah: sel kanker lidah SP-C1 yang konfluen (penuh) dipanen menggunakan EDTA 0,25%. Sebanyak  $2 \times 10^5$  sel dibiakkan dalam 6 cawan dengan diameter 60 mm, kemudian masing-masing diberi coverslip. Pemiakan sel dilakukan sesuai dengan jumlah konsentrasi ekstrak yang digunakan, sel-sel kemudian diinkubasi selama 24 jam.

Setelah 24 jam, cairan dalam cawan diaspirasi dengan pipet, dan dicuci menggunakan PBS, kemudian diaspirasi kembali. Selanjutnya difiksasi dengan alkohol 70% selama 10 menit, kemudian coverslip diambil dan diletakkan di atas gelas objek. Sel-sel pada coverslip kemudian diwarnai dengan larutan akridin oranye dan etidium bromida. Preparat diamati dengan mikroskop fluoresens dengan perbesaran 40x. Sel dengan inti hijau terang yang utuh adalah sel hidup, dan inti kuning hingga oranye adalah sel yang mengalami apoptosis. Kemudian dihitung sel-sel yang mengalami apoptosis dalam dua lapang pandang dan jumlah sel di setiap lapang adalah rata-rata 100 sel.

### Hasil

Penelitian dilakukan dengan menghitung jumlah sel kanker lidah Supri's Clone (SP-C1) yang telah diberi perlakuan ekstrak etanol kulit manggis dalam beberapa konsentrasi yang terdiri dari kontrol, 300, 400, 500, 600, 700 µg/ml dalam rentang waktu 24 jam. Sel-sel yang telah diinkubasi pada gelas objek kemudian ditetesi dengan akridin oranye dan etidium bromida. Dengan menggunakan jenis pewarnaan tersebut, jumlah sel yang mengalami apoptosis diamati menggunakan mikroskop fluoresens. Rata-rata apoptosis sel dengan waktu inkubasi 24 jam dapat dilihat pada Tabel 1. Perhitungan dilakukan untuk menghitung jumlah sel yang mengalami apoptosis. Hasil perhitungan berdasarkan 6 kelompok konsentrasi ekstrak etanol yang berbeda, kemudian dihitung persentase apoptosis sel.

**Tabel 1.** Persentase rata-rata apoptosis sel SP-C1

Konsentrasi (µg/ml)	Jumlah sel apoptosis	Persentase rata-rata apoptosis
Kontrol (0)	0	0%
300	8	85%
400	30	30%
500	45	45%
600	61	61%
700	65	65%



## Bab 6

### Potensi Bawang Dayak dan Tapak Liman dalam Pengobatan Kanker Lidah

#### A. Efek Ekstrak Umbi Bawang Dayak dalam Menghambat Migrasi Sel dan Apoptosis pada Sel Kanker Lidah

Karsinoma sel skuamosa oral (OSCC) adalah jenis kanker mulut yang paling umum secara histologis yang muncul dari sel epitel skuamosa dalam rongga mulut. Kanker ini umumnya menyerang dasar mulut dan lidah. Berbagai cara pengobatan dikembangkan untuk menangani OSCC, termasuk kemoterapi, radioterapi, pembedahan, atau kombinasinya. Namun, pengobatan ini menyebabkan banyak efek samping.

Penemuan dan pengembangan agen terapi baru yang berasal dari sumber alami, terutama tanaman dengan efek samping yang lebih sedikit akhir-akhir ini menjadi salah satu fokus utama dalam penelitian onkologi. Beberapa tanaman telah dilaporkan memiliki efek antikanker, termasuk *Brucea javanica*, *Cinnamomum cassia*, *Myristica fragrans*, dan *Oroxylum indicum*. Tanaman telah dikenal sebagai sumber yang kaya akan berbagai senyawa aktif, termasuk flavonoid, yang dilaporkan dapat menghambat proliferasi kanker melalui penghambatan siklus sel, aktivitas antiproliferatif dan antioksidatif, induksi apoptosis, peningkatan diferensiasi, penghambatan angiogenesis dan aktivasi metabolisme

karsinogen, dan modulasi resistensi multidrug. Selain itu, beberapa senyawa fenolik nonflavonoid juga telah dilaporkan memiliki sifat antikanker, seperti asam caffeic.

*Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. adalah tanaman obat tradisional yang termasuk dalam keluarga Iridaceae. Umbinya biasa digunakan untuk pengobatan kanker payudara, hipertensi, stroke, dan diabetes melitus. Selain itu juga digunakan untuk meningkatkan produksi ASI dan mengobati gangguan seksual. Umbi *E. bulbosa* juga dilaporkan memiliki aktivitas antimikroba dan antioksidan.

*Eleutherine bulbosa* mengandung berbagai macam senyawa, terutama naftokuinon, antrakuinon, dan naftalen. Senyawa utama yang ditemukan dalam tanaman ini adalah eleutherin, isoeleutherin, dan eleutherol. Beberapa senyawa yang diperoleh dari umbi *E. bulbosa* telah dilaporkan menunjukkan aktivitas antikanker, seperti 6,8-hidroksi-3,4-di-metoksi-1-metil-antrakuinon-2-asam karboksilat metil ester, eleutherinosida C, dan isoeleutherin.

Ekstrak umbi *Eleutherine bulbosa* (EBBE) telah dilaporkan menunjukkan sitotoksitas terhadap beberapa jenis kanker pada manusia, seperti kanker serviks (line HeLa), kanker usus besar (line SW480, HCT116, DLD1, WiDr), kanker payudara (line T47D), leukemia (line K562), dan retinoblastoma (WERI-Rb-1). Namun, efek sitotoksik EBBE terhadap sel kanker lidah manusia belum diteliti. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi efek EBBE terhadap viabilitas, apoptosis, dan aktivitas migrasi sel kanker lidah.

## **Bahan dan Metode**

### **Persiapan ekstrak umbi *E. bulbosa* (EBBE)**

Umbi *E. bulbosa* diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik Indonesia (Balitbu Tropika), Indonesia. Identifikasi tanaman dilakukan oleh ahli botani di Pusat Penelitian Konservasi Tumbuhan dan Kebun Raya, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Indonesia (No. B-1269/IPH.3/KS/X/2020). EBBE diekstraksi dengan metode maserasi. Secara singkat, umbi *E. bulbosa* dicincang dan dikeringkan. Bahan kering

diekstraksi dengan etanol 70%, disaring dan diuapkan menggunakan rotary evaporator. EBBE kasar yang dihasilkan kemudian disimpan pada suhu 4°C.

Kultur sel HSC-3 dilakukan seperti yang telah dijelaskan sebelumnya dengan modifikasi. Lini sel HSC-3 dibeli dari Sigma-Aldrich Pte. Ltd. (St. Louis, MO, USA). Sel HSC-3 dikultur dalam medium lengkap yang mengandung Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich), 10% serum bovine fetal (FBS) (PAN-Biotech, Aidenbach, Jerman), 50 U/mL penisilin dan 50 µg/mL streptomisin (Sigma-Aldrich) dalam inkubator berhumiditas 5% CO<sub>2</sub> pada suhu 37°C. Sel HSC-3 kemudian dipisahkan dengan larutan tripsin-asam etilendiamintetraasetat (EDTA) (Sigma-Aldrich) setelah mencapai konfluensi 80%. Setelah mencapai jumlah sel yang diinginkan, sel HSC-3 ditanam ke dalam plat 24-sumur dan plat 96-sumur untuk pengujian lebih lanjut.

### **Uji viabilitas sel**

Jumlah sel hidup diukur secara kuantitatif menggunakan uji 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida (MTT) seperti yang telah dijelaskan sebelumnya dengan modifikasi. Secara singkat, 5 × 10<sup>3</sup> sel HSC-3 ditanam ke dalam plat 96-sumur dan kemudian diberi perlakuan dengan EBBE (1, 10, atau 100 µg/mL), 1 µM Doxorubicin (Dankos Farma, Jakarta, Indonesia) atau hanya medium selama 24 jam. Setelah itu, 100 µL MTT (Sigma-Aldrich) dalam medium kultur ditambahkan ke setiap sumur. Setelah menginkubasi plat selama 4 jam, medium kultur dibuang, dan kristal formazan yang terbentuk dilarutkan dalam 100 µL dimetilsulfoksida (DMSO). Hasil diukur pada OD570 menggunakan pembaca mikroplat (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Setiap kelompok eksperimen diukur dalam enam ulangan. Selain itu, jumlah sel yang tidak diberi perlakuan dihitung dengan hemositometer dan digunakan untuk menginterpolasi nilai OD570 sel HSC-3.

### **Uji Sub-G1**

Untuk menyelidiki efek sitotoksik EBBE pada sel HSC-3, jumlah sel apoptosis ditentukan menggunakan uji sub-G1 seperti yang telah dijelaskan sebelumnya dengan modifikasi. Sel HSC-3 yang diberi perlakuan dan tidak diberi perlakuan dipanen dan disuspensi dalam 450  $\mu$ L larutan fluorokrom hipotonik yang mengandung 50  $\mu$ g/mL propidium iodida (Sigma-Aldrich), 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich), dan 0,1% natrium sitrat (Wako, Osaka, Jepang). Setelah itu, suspensi sel diinkubasi dalam gelap selama 2 jam pada suhu ruangan. Fluoresensi dari masing-masing inti sel diukur menggunakan flow sitometer FACSCanto II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) pada 100.000 kejadian.

### **Uji Gores (Scratch assay)**

Uji gores dilakukan seperti yang telah dijelaskan sebelumnya. Sel HSC-3 ( $5 \times 10^4$ ) ditanam ke dalam plat 24-sumur dan diinkubasi semalam. Goresan dibuat pada setiap sumur dengan ujung pipet mikro kuning. Kemudian, sumur-sumur tersebut dicuci dengan larutan penyangga fosfat (PBS) (Wako) dan diberi perlakuan dengan/tanpa EBBE atau 20  $\mu$ M cyclopamine tartrate (BioVision, Milpitas, CA, USA) (sebagai kontrol positif) selama 24 jam. Penutupan celah diamati dan didokumentasikan di bawah mikroskop cahaya terbalik (Carl Zeiss, Jena, Jerman)

### **Uji Transwell**

Uji transwell dilakukan seperti yang telah dijelaskan sebelumnya dengan modifikasi. Sel HSC-3 ( $5 \times 10^4$ ) ditanam dalam sisipan ruang dengan ukuran pori 8  $\mu$ m (Merck, Darmstadt, Jerman). Setelah itu, 800  $\mu$ L medium kultur dengan/tanpa EBBE atau 20  $\mu$ M cyclopamine tartrate dimasukkan ke dalam setiap sumur pada plat 24-sumur. Sisipan ruang yang berisi sel HSC-3 kemudian ditempatkan pada plat 24-sumur. Setelah menginkubasi ruang tersebut selama 24 jam pada suhu 37°C, sel-sel yang bermigrasi di permukaan bawah ruang difiksasi. Sel-sel tersebut dihitung dan didokumentasikan di bawah mikroskop cahaya terbalik.

## **Immunoblotting**

Tingkat ekspresi protein Sonic hedgehog (SHH) diukur menggunakan metode immunoblotting seperti yang telah dijelaskan sebelumnya dengan modifikasi. Sel HSC-3 dilisis dan dihomogenisasi dengan buffer sampel Laemmli (Bio-Rad). Protein dari setiap kelompok eksperimen dipisahkan dengan elektroforesis gel poliakrilamida-sodium dodesil sulfat (SDS-PAGE) dan ditransfer ke lembaran polivinilidena difluorida (PVDF). Setelah pemblokiran dengan larutan susu skim 5%, lembaran tersebut diinkubasi dengan antibodi monoklonal kelinci anti-SHH sebagai antibodi primer dan antibodi kambing anti-kelinci yang dikonjugasi dengan horseradish peroksidase (HRP) sebagai antibodi sekunder (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Hasil immunoblot dianalisis menggunakan perangkat lunak ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) untuk mengukur densitas setiap pita SHH.

## **Analisis statistik**

Analisis statistik dilakukan menggunakan IBM SPSS Statistics versi 26.0 (SPSS IBM, Armonk, NY, USA). Uji Shapiro-Wilk digunakan sebagai uji normalitas. Perbedaan hasil uji MTT, uji sub-G1, dan uji gores antara kelompok eksperimen dianalisis menggunakan Kruskal-Wallis H dengan analisis post hoc Mann-Whitney U. Sementara itu, perbedaan hasil uji transwell dan densitas pita SHH antara kelompok eksperimen dianalisis menggunakan analisis varians satu arah (ANOVA) dengan analisis post hoc Tukey's honestly significant difference (HSD). Semua hasil dinyatakan sebagai rata-rata  $\pm$  standar deviasi (SD). Nilai  $P < 0,05$  dianggap signifikan secara statistik.

## **Hasil**

### **EBBE mengurangi jumlah sel HSC-3 yang hidup**

Jumlah sel HSC-3 yang hidup yang dikultur dalam medium yang mengandung pelarut ekstrak (kelompok sham) selama 24 jam adalah  $9.607 \pm 13,81$ . Perlakuan dengan EBBE menunjukkan bahwa viabilitas sel HSC-3 secara signifikan lebih rendah dibandingkan dengan kelompok sham ( $P < 0,05$ ) dengan cara yang bergantung pada konsentrasi. Jumlah

sel HSC-3 yang hidup yang diberi perlakuan dengan 1, 10, dan 100 µg/mL EBBE masing-masing adalah  $9.055 \pm 268,69$ ,  $6.777 \pm 278,04$ , dan  $3.659 \pm 32,86$ . Viabilitas sel HSC-3 yang diberi perlakuan EBBE secara signifikan lebih tinggi ( $P < 0,05$ ) dibandingkan dengan sel HSC-3 yang diberi perlakuan Doxorubicin ( $226 \pm 32,34$ ). Temuan ini menunjukkan bahwa EBBE dapat mengurangi viabilitas sel HSC-3.

### **EBBE menginduksi apoptosis sel HSC-3**

Hasil uji Sub-G1 menunjukkan bahwa persentase apoptosis kelompok sham adalah  $8,27 \pm 0,14\%$ . Sel HSC-3 yang mengalami apoptosis secara signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok sham ( $P < 0,05$ ) dengan cara yang bergantung pada konsentrasi setelah perlakuan EBBE. Persentase apoptosis sel HSC-3 yang diberi perlakuan dengan 1, 10, dan 100 µg/mL EBBE masing-masing adalah  $9,60 \pm 0,35\%$ ,  $17,78 \pm 0,32\%$ , dan  $38,64 \pm 0,70\%$ . Persentase ini secara signifikan lebih rendah ( $P < 0,05$ ) dibandingkan dengan sel HSC-3 yang diberi perlakuan Doxorubicin ( $95,95 \pm 2,60\%$ ). Oleh karena itu, hasil ini menunjukkan bahwa perlakuan EBBE dapat meningkatkan apoptosis sel HSC-3.

### **EBBE menghambat migrasi sel HSC-3**

Persentase penutupan celah sel HSC-3 yang dikultur dalam medium yang mengandung pelarut ekstrak setelah 24 jam adalah  $96,11 \pm 4,17\%$ . Setelah perlakuan EBBE, aktivitas migrasi sel HSC-3 secara signifikan lebih rendah dibandingkan dengan kelompok sham ( $P < 0,05$ ) dengan cara yang bergantung pada konsentrasi. Persentase penutupan celah sel HSC-3 yang diberi perlakuan dengan 1, 10, dan 100 µg/mL EBBE masing-masing adalah  $89,56 \pm 5,77\%$ ,  $76,78 \pm 4,87\%$ , dan  $60,67 \pm 7,62\%$ . Persentase ini secara signifikan lebih tinggi ( $P < 0,05$ ) dibandingkan dengan sel HSC-3 yang diberi perlakuan cyclopamine tartrate ( $43,00 \pm 4,82\%$ ).

Uji transwell juga menunjukkan hasil yang serupa. Jumlah sel HSC-3 yang bermigrasi dalam kelompok sham adalah  $134,44 \pm 11,60$ . Jumlah HSC-3 yang bermigrasi sel secara signifikan lebih rendah daripada kelompok sham ( $P < 0,05$ ) dengan cara yang bergantung pada konsentrasi setelah perawatan EBBE. Jumlah sel HSC3 yang bermigrasi

yang diobati dengan 1, 10, dan 100  $\mu\text{g} / \text{mL}$  EBBE adalah  $107.44 \pm 15.21$ ,  $95.11 \pm 6.01$ , dan  $39.22 \pm 3.56$ , masing-masing. Angka-angka ini secara signifikan lebih tinggi ( $P < 0,05$ ) dibandingkan dengan yang diobati dengan siklopamin tartrat Sel HSC-3 ( $17,89 \pm 3,22$ ). Secara keseluruhan, hasil ini menunjukkan bahwa EBBE menunjukkan efek antimigratory terhadap sel HSC-3.

### **EBBE menurunkan regulasi ekspresi SHH**

Setelah penambahan EBBE, tingkat ekspresi SHH pada sel HSC-3 menurun secara bergantung pada konsentrasi. Tingkat ekspresi SHH pada sel HSC-3 yang diobati dengan 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EBBE secara signifikan lebih tinggi ( $P < 0,05$ ), sementara tingkat ekspresi SHH pada sel HSC-3 yang diobati dengan 10 dan 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EBBE secara signifikan lebih rendah ( $P < 0,05$ ) dibandingkan dengan kelompok kontrol. Tingkat ekspresi SHH pada sel HSC-3 yang diobati dengan 1 dan 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EBBE secara signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan sel HSC-3 yang diobati dengan siklopamin tartrat ( $P < 0,05$ ). Namun, tidak ada perbedaan signifikan yang diamati pada tingkat ekspresi SHH antara pengobatan siklopamin tartrat dan EBBE 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $P = 0,142$ ). Dengan demikian, temuan ini menunjukkan bahwa EBBE dapat menurunkan ekspresi SHH.

### **Pembahasan**

Dalam penelitian ini, kami menyelidiki potensi EBBE sebagai agen antikanker untuk pengobatan OSCC. EBBE menunjukkan efek sitotoksik terhadap sel HSC-3 dengan mengurangi viabilitas sel HSC-3 secara bergantung pada konsentrasi. Penurunan viabilitas sel HSC-3 disebabkan oleh apoptosis. Hasil ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa EBBE mampu menginduksi apoptosis pada sel kanker. EBBE juga dilaporkan dapat menghambat siklus sel pada beberapa garis sel yang mengindikasikan bahwa EBBE mungkin menginduksi apoptosis pada sel HSC-3 melalui penahanan siklus sel karena kedua proses tersebut saling berhubungan. Berdasarkan studi docking molekuler, eleutherol, eleutherin, dan isoeleutherin dapat menginduksi apoptosis dengan mengaktifkan caspase-827.

Migrasi sel adalah salah satu proses kunci yang terlibat dalam metastasis kanker. Uji scratch dan transwell menunjukkan bahwa EBBE menahan migrasi sel HSC-3 secara bergantung pada konsentrasi. Hal ini menunjukkan aktivitas baru dari EBBE dalam menghambat migrasi sel HSC-3. Oleh karena itu, EBBE mungkin memiliki aktivitas anti-metastasis terhadap sel kanker lidah.

Metastasis kanker lidah diatur oleh beberapa protein, termasuk SHH. Salah satu jalur pensinyalan SHH yang dilaporkan mengatur migrasi sel pada kanker lidah adalah SHH/glioma-associated oncogene homologue (SHH/GLI). Protein SHH berikatan dan menginaktivasi reseptornya, Patched 1 (PTCH1). Interaksi ini menyebabkan aktivasi faktor transkripsi dari keluarga GLI, yang berperan penting dalam mengatur migrasi, invasi, dan proliferasi kanker.

Penelitian ini mengungkapkan bahwa EBBE menurunkan tingkat ekspresi SHH seiring dengan peningkatan konsentrasi EBBE, menunjukkan bahwa efek penghambatan EBBE terhadap ekspresi SHH mungkin berperan dalam sifat anti-migrasinya. Sejauh yang kami ketahui, ini adalah penelitian pertama yang menunjukkan penurunan ekspresi SHH pada sel HSC-3 yang diobati dengan EBBE. EBBE mungkin menghambat migrasi sel HSC-3 melalui penghambatan jalur pensinyalan SHH/GLI. Kemungkinan semua jalur pensinyalan yang diatur oleh SHH dapat dihambat oleh EBBE. EBBE juga mungkin menahan migrasi sel HSC-3 melalui jalur lain. Pada garis sel kanker usus besar SW480, eleutherioside C dan isoeleutherin yang diperoleh dari umbi *E. bulbosa* dilaporkan menghambat jalur Wnt/ $\beta$ -catenin, yang diketahui berperan penting dalam mengatur migrasi kanker. Oleh karena itu, jalur pensinyalan yang terlibat dalam penghambatan migrasi sel HSC-3 oleh EBBE masih perlu dieksplorasi. Selain itu, komponen pensinyalan hilir dari SHH dan molekul target yang dipengaruhi oleh EBBE harus diidentifikasi. Karena EBBE juga mengandung berbagai senyawa bioaktif, penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengidentifikasi senyawa mana yang bertanggung jawab atas aktivitas apoptosis dan anti-migrasi. Oleh karena itu, diperlukan investigasi

lebih lanjut untuk memahami mekanisme molekuler yang mendasari apoptosis sel HSC-3 yang diinduksi oleh EBBE dan mengonfirmasi jalur pensinyalan SHH mana yang berkontribusi pada penghambatan migrasi sel oleh EBBE.

## B. Ekstrak Daun Tapak Liman Meningkatkan Sensitivitas Doxorubicin pada Sel Kanker Lidah

Bidang penelitian produk alami berkembang pesat, terutama dalam pencarian agen antikanker yang efektif yang diperkenalkan dari tanaman. Produk alami sangat cocok untuk tujuan ini karena efek sampingnya yang minimal, kemampuannya untuk menargetkan berbagai proses kanker, dan potensi efek sinergis. Keanekaragaman dan kapasitas kimianya yang kompleks membuatnya menjadi kandidat yang berharga untuk penemuan dan pengembangan obat. Di antara banyak tanaman yang diteliti, *Elephantopus scaber* Linn, yang dikenal sebagai Kaki Gajah dan termasuk dalam keluarga Asteraceae, menonjol karena penggunaan tradisionalnya dalam pengobatan tradisional dan hasil yang menjanjikan dalam penelitian modern.

Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa beberapa bagian dari *E. scaber*, seperti daun dan akar, memiliki aktivitas farmakologis karena komposisi kimianya yang kaya. Tanaman ini telah menarik perhatian karena manfaat terapeutiknya yang potensial. *E. scaber* mengandung berbagai metabolit bioaktif, termasuk flavonoid, triterpenoid, dan lakton seskuiterpen. Flavonoid dalam tanaman ini terkenal dengan sifat antioksidan dan antiinflamasi yang kuat. Triterpenoid semakin meningkatkan nilai terapeutik tanaman dengan efeknya yang beragam, termasuk aktivitas anti-inflamasi dan antimikroba. Selain itu, lakton seskuiterpen, karena strukturnya yang kompleks, dikenal karena efek biologisnya yang kuat, seperti menginduksi kematian sel dan menghambat pertumbuhan sel.

Proses kematian sel yang diatur, apoptosis, memainkan peran penting dalam menghilangkan sel kanker dan menghambat perkembangan

tumor. Proses ini dapat dipicu oleh jalur mitokondria (intrinsik), yang dimediasi oleh caspase-9, atau jalur reseptor kematian (ekstrinsik), yang dimediasi oleh caspase-8. Pada akhirnya, kedua jalur tersebut bertemu untuk mengaktifkan efektor caspase-3 dan -7, yang menjalankan program kematian sel. Pada akhirnya, kedua jalur tersebut bertemu untuk mengaktifkan efektor caspase-3 dan -7, yang menjalankan program kematian sel. Salah satu regulator penting apoptosis adalah Survivin, anggota kunci dari keluarga protein penghambat apoptosis (IAP). Survivin sangat penting dalam mengatur apoptosis dengan menghambat aktivitas caspase dan meningkatkan kelangsungan hidup sel. Varian terfosforilasi dari Survivin, yang dikenal sebagai p-Survivin (p-Surv) treonin 34 (Thr34), memodulasi lebih lanjut fungsi ini dengan mengubah interaksinya dengan mesin apoptosis. Fosforilasi pada Thr34 mempengaruhi stabilitas Survivin dan kemampuannya untuk mengikat aktivator caspase yang diturunkan dari mitokondria kedua / penghambat langsung protein pengikat apoptosis dengan pI rendah (Smac / DIABLO), protein mitokondria yang mendorong apoptosis dengan memusuhi IAP.

Penelitian sebelumnya telah melaporkan efek ekstrak daun *E. scaber* (ESLE) pada garis sel kanker payudara dan garis sel kanker kolorektal. Namun, penelitian tentang efek ESLE pada karsinoma sel skuamosa mulut (OSCC), terutama kanker lidah, masih kurang. Selain itu, mekanisme apoptosis yang dipicu oleh ESLE belum dipahami dengan baik dan memerlukan penyelidikan lebih lanjut. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menguji efek ESLE pada viabilitas sel dan apoptosis pada sel kanker lidah karsinoma sel skuamosa manusia (HSC)-3.

## **Metode**

### **1. Persiapan ESLE**

Daun *E. scaber* L. diperoleh dari Balai Pengujian Instrumen Tanaman Rempah, Obat dan Aromatik, Kementerian Pertanian. ESLE diperoleh dengan menggunakan teknik maserasi. Daun *E. scaber* dirajang halus dan dikeringkan. Bahan yang telah dikeringkan diekstraksi dengan larutan etanol 70%, diikuti dengan penyaringan dan penguapan

menggunakan rotary evaporator. ESLE kasar yang diperoleh kemudian disimpan pada suhu 4°C.

## 2. Kultur Sel HSC-3

Kultur sel HSC-3 dilakukan dengan menggunakan metode yang telah dilaporkan sebelumnya, dengan modifikasi tertentu. Garis sel HSC-3 diperoleh dari Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Sel HSC-3 dikultur dalam media elang yang dimodifikasi Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich) yang mengandung 50 U / mL penisilin 50 µg / mL, streptomisin (Sigma-Aldrich) dan 10% fetal bovine serum (FBS) (PAN-Biotech, Aidenbach, Jerman). Sel-sel dikultur dalam inkubator yang dilembabkan pada suhu 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Sel HSC-3 dilepaskan dengan larutan trypsin-ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) (Sigma-Aldrich) setelah mencapai 80% pertemuan.

## 3. Uji Viabilitas Sel

Pengukuran viabilitas sel dilakukan dengan uji 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida (MTT), mengikuti metode yang telah dilaporkan sebelumnya.(13) Pada 96-well plate, sel HSC-3 ditempatkan (5 × 10<sup>3</sup> /well) dan diberi perlakuan dengan/tanpa 1, 10, atau 100 µg/mL ESLE atau 1 µM Doksorubisin (Dankos Farma, Jakarta, Indonesia) selama 24 jam. MTT ditambahkan ke dalam sumuran yang telah diberi perlakuan (100 µL/sumuran) dan diinkubasi selama 4 jam. Kemudian, suspensi dalam setiap sumuran dibuang dan dilarutkan dalam 100 µL dimethylsulfoxide (DMSO). Kristal formazan yang terbentuk diukur dengan menggunakan microplate reader (BioRad, Hercules, CA, USA) pada OD570. Pengukuran untuk setiap kelompok eksperimen dilakukan dalam sextuplicate.

## 4. Uji Sub-G1

Sel HSC-3 yang mengalami apoptosis diukur dengan menggunakan uji sub-G1 untuk mengevaluasi efek sitotoksik ESLE, berdasarkan metode yang telah dilaporkan sebelumnya. Sel HSC-3 yang diberi perlakuan dikumpulkan dan diinkubasi dalam larutan fluorokrom hipotonik (50 µg / mL propidium iodida (Sigma-Aldrich), 0,1%

Triton X-100 (Sigma-Aldrich), dan 0,1% natrium sitrat (Wako, Osaka, Jepang). Selanjutnya, suspensi sel diinkubasi dalam kegelapan selama 30 menit. Fluoresensi inti individu dikuantifikasi menggunakan flowcytometer FACSCanto II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), dan total 400 peristiwa dicatat.

#### 5. Uji Western Blotting

Sel HSC-3 yang diberi perlakuan dengan/tanpa berbagai konsentrasi ESLE atau 25 nM YM155 (Tocris, Bristol, UK) kemudian dipanen dan diinkubasi dengan radioimmunoprecipitation assay (RIPA) lysis buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). YM155, penekan survivin, digunakan sebagai kontrol positif dalam penelitian ini untuk menunjukkan kemampuannya dalam mengurangi atau menghambat p-Surv. Sampel dipisahkan dengan elektroforesis gel natrium dodesil sulfatopolyacrylamide (SDS-PAGE) dan dipindahkan ke lembaran polivinilidena difluorida (PVDF). Setelah diblokir dengan susu skim 5% dalam Tris-buffered saline (TBS, 150 nM NaCl dan 50 nM Tris-HCl, pH 7.4), lembaran diinkubasi dengan antibodi poliklonal kelinci anti- $\beta$ -Actin (Cat. No. 4967; Cell Signaling, Danvers, MA, USA) dan antibodi poliklonal kelinci anti-fosfo-survivin (Thr34) (Cat. No. 8888; Cell Signaling). Antibodi sekunder adalah antibodi IgG anti-kelinci anti-kelinci terkonjugasi lobak peroksidase terkonjugasi lobak (Cell Signaling), diencerkan 1: 1000. Antibodi yang terikat divisualisasikan menggunakan Clarity Western ECL (BioRad) dan ditangkap menggunakan Alliance 4.7 (UVItech, Cambridge, UK).

#### 6. Analisis Statistik

Uji normalitas Shapiro-Wilk digunakan untuk analisis statistik. Kemudian, uji ANOVA satu arah digunakan untuk menganalisis temuan dari kumpulan data yang terdistribusi normal, diikuti dengan uji post-hoc Tukey. Selanjutnya, hasil distribusi data yang tidak normal diuji dengan menggunakan uji Kruskal-Wallis, diikuti dengan uji post-hoc Mann-Whitney.

## Hasil

### ESLE Menurunkan Sel Layak HSC-3

Jumlah sel viabel HSC3 pada kelompok doxorubicin 1  $\mu\text{M}$  ( $56 \pm 11,12$ ) secara signifikan lebih rendah (uji post-hoc Mann-Whitney,  $p = 0,004$ ) dibandingkan dengan kelompok sham ( $9.212 \pm 65,58$ ). Jumlah sel HSC-3 yang layak pada kelompok yang diobati dengan ESLE menurun secara signifikan (Kruskal Wallis,  $p = 0,001$ ) dengan cara yang bergantung pada konsentrasi. Jumlah sel HSC-3 yang layak pada kelompok yang diobati dengan 1  $\mu\text{g} / \text{mL}$  ESLE ( $9.268 \pm 424,76$ ) tidak berbeda secara signifikan (uji post-hoc Mann-Whitney,  $p = 0,423$ ) dibandingkan dengan kelompok sham, sedangkan jumlah sel HSC-3 yang layak pada kelompok yang diobati dengan 10  $\mu\text{g} / \text{mL}$  ESLE ( $8.173 \pm 316,61$ ) dan kelompok yang diobati dengan ESLE 100  $\mu\text{g} / \text{mL}$  ( $6.952 \pm 602,94$ ) berbeda secara signifikan (uji post-hoc Mann-Whitney,  $p = 0,004$ ) dibandingkan dengan kelompok sham. Pada uji MTT ini, konsentrasi  $\text{IC}_{50}$  ESLE dalam menginduksi apoptosis sel HSC-3 adalah 222,34  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### ESLE Meningkatkan Sel Apoptosis HSC-3

Persentase sel apoptosis HSC-3 pada kelompok doxorubicin 1  $\mu\text{M}$  ( $95,73 \pm 0,48\%$ ) secara signifikan lebih tinggi (uji post-hoc Tukey,  $p = 0,001$ ) dibandingkan dengan kelompok sham ( $4,62 \pm 0,48\%$ ). Persentase sel apoptosis HSC-3 pada kelompok yang diobati dengan ESLE meningkat secara signifikan (ANOVA,  $p = 0,001$ ) dengan cara yang bergantung pada konsentrasi. Persentase sel apoptosis HSC-3 pada kelompok yang diobati dengan ESLE 1  $\mu\text{g} / \text{mL}$  ( $6,08 \pm 0,34\%$ ) tidak berbeda secara signifikan (uji post-hoc Tukey,  $p = 0,120$ ) dibandingkan dengan yang ada pada kelompok sham, sementara itu persentase sel apoptosis HSC-3 pada kelompok yang diobati dengan ESLE 10  $\mu\text{g} / \text{mL}$  ( $18,88 \pm 0,75\%$ ) dan kelompok yang diobati dengan 100  $\mu\text{g} / \text{mL}$  ESLE ( $33,45 \pm 2,09\%$ ) berbeda secara signifikan (uji post-hoc Tukey,  $p = 0,001$ ) dibandingkan dengan yang ada di kelompok sham.

### **Kombinasi 100 µg/mL ESLE dengan 0,25 µM Doksorubisin Meningkatkan Sel Apoptosis HSC-3**

Persentase sel apoptosis HSC-3 pada kelompok doksorubisin 1 µM ( $95,71 \pm 0,47\%$ ) secara signifikan lebih tinggi (uji post-hoc Mann-Whitney,  $p = 0,004$ ) dibandingkan dengan kelompok ESLE 100 µg/mL + 0,25 µM.

Sel HSC-3 diberi makan selama 12 jam dan kemudian diobati dengan/ tanpa 1 µM Doxorubicin atau ESLE dalam konsentrasi yang berbeda selama 24 jam. Sel-sel yang layak diukur menggunakan uji MTT seperti yang diuraikan dalam metode. Hasilnya disajikan sebagai rata-rata  $\pm$  standar deviasi ( $n = 6$ ). \* Signifikansi statistik ( $p < 0,05$ ) ditentukan dengan menggunakan uji post-hoc Mann-Whitney bila dibandingkan dengan kelompok sham.

Kelompok yang diobati dengan doksorubisin ( $65,00 \pm 10,05\%$ ). Persentase sel apoptosis HSC-3 pada kelompok 0,25 µM Doxorubicin ( $22,98 \pm 5,98\%$ ) dan kelompok yang diobati dengan 100 µg/mL ESLE ( $33,45 \pm 2,09\%$ ) rendah. Namun, persentase sel apoptosis HSC-3 pada kelompok yang diobati dengan 100 µg / mL ESLE + 0,25 µM doksorubisin secara signifikan lebih tinggi (uji post-hoc MannWhitney,  $p = 0,004$ ) dibandingkan dengan kelompok yang diobati dengan 0,25 µM Doksorubisin dan kelompok yang diobati dengan 100 µg / mL ESLE.

### **ESLE Menurunkan p-Surv (Thr34) Sel HSC-3**

Jumlah p-Surv (Thr34) sel HSC-3 pada kelompok YM155 ( $28 \pm 7$ ) secara signifikan lebih rendah (uji post-hoc Tukey,  $p = 0,000$ ) dibandingkan dengan kelompok sham ( $933 \pm 49,14$ ).  $\beta$ -Actin digunakan sebagai kontrol pemuatan. Jumlah p-Surv (Thr34) pada kelompok yang diobati dengan ESLE menurun secara signifikan (ANOVA,  $p = 0,000$ ) dengan cara yang bergantung pada konsentrasi. Jumlah p-Surv (Thr34) pada kelompok yang diobati dengan ESLE 1 µg / mL ( $659 \pm 125,74$ ), kelompok yang diobati dengan ESLE 10 µg / mL ( $408 \pm 36,47$ ) dan kelompok yang diobati dengan ESLE 100 µg / mL ( $179 \pm 62,4$ ) berbeda secara signifikan (uji post-hoc Tukey,  $p = 0,000$ ) dibandingkan dengan kelompok sham.

## Pembahasan

Dalam studi saat ini, ESLE menunjukkan efek sitotoksik yang bergantung pada konsentrasi pada sel HSC-3. Hasil dari uji MTT dan sub-G1 menunjukkan penurunan sel HSC-3 yang layak, yang dikaitkan dengan induksi apoptosis. Temuan ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang melaporkan kemampuan ESLE untuk menginduksi apoptosis pada T47D (kanker payudara), MCF-7 (kanker payudara), dan HCT116 (kanker kolorektal) (18,19)  $IC_{50}$  ESLE dalam menginduksi apoptosis sel HSC-3 (222.34  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) dikategorikan sebagai sitotoksitas lemah (201-500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (22) Nilai  $IC_{50}$  ini lebih tinggi dibandingkan dengan nilai  $IC_{50}$  dalam menginduksi apoptosis sel T47D (132.17 $\pm$ 9.69  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (18), sel MCF-7 (14.69 $\pm$ 0.29  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (19), dan sel HCT116 (14.69 $\pm$ 0.29  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (20). Namun, meskipun memiliki sitotoksitas yang lemah, ESLE dapat meningkatkan potensi doxorubisin dalam menginduksi apoptosis sel HSC-3. Secara khusus, kombinasi 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ESLE dengan 0,25  $\mu\text{M}$  doxorubisin meningkatkan persentase sel apoptosis HSC-3 lebih banyak daripada pengobatan dengan salah satu agen saja. Hasil ini menunjukkan efek sinergis dari kombinasi 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ESLE dan 0,25  $\mu\text{M}$  doxorubisin dalam menginduksi apoptosis pada sel HSC-3. Temuan ini menunjukkan bahwa ESLE dapat meningkatkan kepekaan terhadap efek apoptosis doxorubisin, yang berpotensi memungkinkan dosis doxorubisin yang lebih rendah untuk digunakan dalam terapi kanker, sehingga mengurangi efek samping yang terkait.

Sinergi yang diamati antara ESLE dan doxorubisin kemungkinan besar disebabkan oleh beberapa mekanisme yang saling berinteraksi. Kombinasi ini tampaknya meningkatkan kerusakan DNA yang diinduksi oleh doxorubisin dan menghambat jalur kelangsungan hidup pada sel kanker, membuatnya lebih rentan terhadap doxorubisin. Hasil ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang meneliti efek ESLE yang dikombinasikan dengan tamoxifen pada sel kanker payudara MCF-7. Penelitian ini menunjukkan bahwa ESLE meningkatkan efektivitas tamoxifen dalam menargetkan sel kanker payudara. Kombinasi ESLE dan tamoxifen menyebabkan penghentian siklus sel pada fase S, penurunan

regulasi gen prosurvival heat shock protein (HSP) -105, peningkatan regulasi gen pro-apoptosis, yang melibatkan jalur apoptosis intrinsik dan ekstrinsik.

Penelitian ini menunjukkan bahwa kelompok yang diobati dengan ESLE menunjukkan penurunan kadar p-Surv (Thr34) dalam sel HSC-3 dengan cara yang bergantung pada konsentrasi. Penurunan p-Surv (Thr34) ini sebanding dengan efek YM155, penekan survivin yang dikenal. YM155 telah terbukti menghambat ekspresi survivin dan menginduksi apoptosis di berbagai garis sel kanker. Dalam penelitian ini, YM155 digunakan sebagai kontrol positif untuk memvalidasi efek ESLE pada fosforilasi survivin. Penurunan yang signifikan dalam tingkat p-survivin dalam sel yang diobati dengan ESLE, mirip dengan yang diamati dengan YM155, menggarisbawahi potensi ESLE sebagai agen anti-kanker yang efektif yang menargetkan survivin. Hasil ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan ESLE menurunkan ekspresi survivin pada tingkat transkrip. Survivin, yang terfosforilasi di Thr34 oleh cyclin-dependent kinase (CDK) 1 selama fase G2 / M dari siklus sel, sangat penting untuk fungsi antiapoptosis. Penurunan kadar p-survivin dapat mengganggu fungsi tersebut, sehingga mendorong apoptosis pada sel kanker.

Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk sepenuhnya menjelaskan mekanisme kerja ESLE. Secara khusus, penelitian di masa depan harus memeriksa situs fosforilasi potensial lainnya pada survivin, seperti Ser 70 dan Ser81, yang mungkin penting untuk fungsi antiapoptosisnya. Selain itu, mengeksplorasi efek ESLE pada jalur pensinyalan lain yang terlibat dalam kelangsungan hidup dan proliferasi sel kanker dapat memberikan pemahaman yang lebih komprehensif tentang potensi terapeutiknya.

### **Kesimpulan**

Secara keseluruhan, ESLE secara signifikan meningkatkan kemanjuran doksorubisin, sehingga meningkatkan kepekaan kemampuannya untuk menginduksi apoptosis pada sel kanker lidah HSC-3. Sensitisasi ini terjadi melalui penghambatan aktivitas survivin, khususnya di situs fosforilasi Thr34. Temuan ini menunjukkan bahwa ESLE dapat berfungsi

sebagai bahan pembantu yang potensial untuk meningkatkan efektivitas doksorubisin dalam menginduksi apoptosis pada sel kanker lidah.





## Bab 7

### Ginsenoside dan Propolis sebagai Agen Antikanker

#### A. Ginsenoside sebagai Penghambat Migrasi dan Invasi Kanker Lidah

---

Karsinoma sel skuamosa lidah (TSCC) adalah kanker mulut dengan tingkat keganasan tinggi dan sering terjadi migrasi serta invasi dini. Merokok dan minum alkohol adalah faktor etiologi utama TSCC.<sup>3</sup> Meskipun pengobatan bedah telah meningkatkan tingkat kelangsungan hidup pasien, angkanya tetap rendah. Selain itu, operasi secara signifikan merusak tubuh pasien. Oleh karena itu, terkadang perlu diberikan radioterapi dan kemoterapi untuk mencegah kekambuhan kanker. Dengan demikian, mempelajari beberapa obat dengan efek kerusakan rendah dan terapi gen dapat meningkatkan pencegahan dan pengobatan kanker.

Ginseng adalah nutrisi terkenal dan obat herbal Cina. Konsentrasi tinggi ginsenosida, termasuk ginsenosida Rb1, Rb2, Rc, Rd, dan Re ditemukan dalam ginseng. Ginsenosida Rd memiliki efek antiinflamasi, anti-penuaan, dan perlindungan saraf. Bukti yang berkembang juga menunjukkan bahwa ginseng dan ginsenosida murninya memiliki efek anti-kanker. Penelitian juga menunjukkan bahwa ginsenosida tipe diol memiliki aktivitas anti-kanker yang lebih kuat daripada ginsenosida tipe

triol. Ginsenosida Rd memiliki aktivitas anti-kanker terkuat di antara ginsenosida tipe diol.

Oleh karena itu, ginsenosida Rd dapat menghambat kanker lidah. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa ginsenosida Rb3 dapat mengatur H19, yang mengindikasikan bahwa ginsenosida Rd dapat menghambat kanker lidah dengan mengatur H19. RNA non-coding H19 sangat terekspresi di berbagai kanker. Misalnya, miR-675-5p, micro-RNA dari H19, dapat berikatan dengan beberapa protein pengkode mRNA spesifik, sehingga menghambat ekspresinya.

E-cadherin sangat terkait dengan adhesi sel dan penghambatan kontak. Ekspresi abnormal E-cadherin pada kanker dapat memicu metastasis kanker. Ekspresi E-cadherin menurun pada kanker mulut. Oleh karena itu, ekspresi E-cadherin yang tidak teratur dapat digunakan sebagai penanda biologis untuk diagnosis klinis, pengobatan, dan prognosis tumor, yang menunjukkan bahwa H19/miR-675-5p dan CDH1 mungkin terkait.

CRISPR/Cas9 ditemukan pada bakteri dan archaea. Sistem ini terutama terdiri dari tiga jenis sistem yang berbeda, di mana sistem tipe II *Streptococcus thermophilus* atau *Streptococcus pyogenes* adalah yang paling banyak digunakan. Sistem tipe II didasarkan pada RNA pemandu tunggal (sgRNA) dan protein cas9 yang menargetkan urutan DNA untuk diedit. Sistem CRISPR/Cas9 telah banyak digunakan dalam karakterisasi dan pemodelan kanker dalam beberapa tahun terakhir dan menjanjikan dalam pengobatan kanker. Misalnya, sistem pengiriman penargetan tumor CRISPR/cas9 dapat menurunkan regulasi hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) secara *in vivo*, sehingga menghambat metastasis kanker pankreas.

Meskipun ginsenosida dapat menghambat banyak kanker, hanya sedikit penelitian yang melaporkan efek penghambatan ginsenosida Rd pada kanker lidah dan mekanismenya.<sup>26-28</sup> Penelitian ini bertujuan untuk menilai efek ginsenosida Rd pada migrasi dan invasi sel kanker lidah serta mekanismenya.

## Metodologi

1. Jaringan Kanker Lidah  
Jaringan TSCC (n=3) diambil dari pasien bedah di Rumah Sakit Stomatologi Universitas Jilin (No. 2 tahun 2022) dan disimpan pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$ .
2. Kultur Sel  
Sel SCC9 dan CAL27 (Atcc) dikultur dalam DMEM/F12 yang mengandung 10% FBS dan 1% penisilin/streptomisin (Gibco) dalam inkubator dengan 5% karbon dioksida pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ . Rd  $100\ \mu\text{M}$  (Meilunbio, China) digunakan untuk merawat sel-sel untuk analisis qPCR, WB, apoptosis, migrasi, invasi dan pembentukan koloni.
3. Overekspresi dan Knockdown miR-675-5p dan H19  
pcDNA3.1-H19, plasmid untuk overekspresi H19, bersumber dari GenePharma (Shanghai, China). si-H19, RNA penginterferensi kecil yang mengurangi ekspresi H19, diperoleh dari RiboBio. Inhibitor dan mimik miR-675-5p, yang dapat mengurangi atau mengoverekspresikan miR-675-5p, diperoleh dari RiboBio.
4. Overekspresi dan Knockout CDH1  
pcDNA3.1-CDH1, plasmid untuk overekspresi CDH1, bersumber dari Sangon Biotech. Sistem CRISPR/cas9 digunakan untuk knockout CDH1. px459 (Addgene, USA) digunakan sebagai plasmid knockout. Urutan sgRNA: 5'-AAGTCACGCTGAATACAGTG-3'.
5. Prosedur transfeksi  
Sel SCC9 ditanam dalam enam sumuran ( $3 \times 10^5$  / sumuran). Transfeksi dilakukan ketika kepadatan sel mencapai sekitar 70% setelah dikultur selama 12-24 jam. Pertama, media tanpa FBS dicampur dengan Lipofectamine 2000 dan diinkubasi selama 5 menit. Sampel kemudian dicampur dengan DNA (pcDNA3.1-H19, pcDNA3.1-CDH1, px459-CDH1) atau miRNA (miR-675-5p mimics atau inhibitor) yang diencerkan dalam media tanpa FBS dan diinkubasi selama 20 menit. Campuran tersebut kemudian ditambahkan ke dalam sel, dikocok perlahan agar tercampur, dan dimasukkan ke dalam inkubator. Media

yang mengandung FBS diganti setelah 6 jam, kemudian dikultur selama 24-48 jam.

6. PCR kuantitatif real-time

RNA diekstraksi dari jaringan dan sel kanker lidah (SCC9) menggunakan TRIzol (Invitrogen, AS). Kit sintesis cDNA untai pertama (Tiangen, Cina) digunakan untuk mentranskripsi balik RNA untuk mendapatkan cDNA. SYBR Real-Time PCR kit (Tiangen, Cina) digunakan untuk reaksi qPCR selanjutnya dari cDNA. Kondisi qPCR adalah: 94 ° C awal selama 15 menit, diikuti oleh 35 siklus denaturasi pada 94 ° C selama 15 detik, anil pada 60 ° C selama 30 detik, dan perpanjangan pada 72 ° C selama 20 detik. GAPDH digunakan sebagai gen referensi internal untuk H19 dan CDH1. U6 digunakan sebagai gen referensi internal untuk miR-675-5p. Urutan primer tercantum dalam Gambar S1 dan Gambar S2.

7. Western blot

Buffer ekstraksi protein (Beyotime, China) digunakan untuk mengekstrak protein dari jaringan dan sel kanker lidah. Kit BCA (Meilunbio, China) digunakan untuk mengukur konsentrasi protein. Khususnya, gel SDS-PAGE 10% digunakan untuk mengisolasi protein dengan berat molekul yang berbeda ketika konsentrasi protein dari kelompok eksperimen dan kelompok kontrol sama. Selanjutnya, membran PVDF digunakan untuk mentransfer protein yang telah diisolasi. Membran PVDF diblokir dengan 5% susu bubuk tanpa lemak selama 1 jam, kemudian diinkubasi dengan antibodi terhadap E-cadherin (Proteintech, USA) dan GAPDH (Bioworld, USA) pada suhu 4°C semalaman. Membran PVDF kemudian dicuci dengan TBST dan diinkubasi dengan antibodi sekunder (Boster, China) selama 2 jam. ECL Super Signal (Thermo Fisher Scientific, USA) digunakan untuk mendeteksi pita protein. Perangkat lunak ImageJ digunakan untuk analisis kuantitatif pita protein.

8. Uji Penyembuhan Luka

Sel SCC9 ditempatkan dalam pelat enam sumur ( $3 \times 10^5$ /sumur). Setelah dilakukan transfeksi, goresan dibuat sambil menumbuhkan sel dalam medium bebas serum. Gambar diambil pada 0, 24, dan 48 jam menggunakan mikroskop terbalik. Perangkat lunak ImageJ digunakan untuk menganalisis hasilnya.

9. Uji transwell

Dalam uji transwell, ruang atas (Corning, AS) diisi dengan 20  $\mu$ L Matrigel (BD Biosciences, AS), kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C di bawah 5% CO<sub>2</sub> selama 30 menit. Sel SCC9 ( $1 \times 10^4$ ) diunggulkan, kemudian ditransfeksi dengan si-H19, pcDNA3.1-H19, miR-675- 5p inhibitor, miR-675-5p mimics, pcDNA3.1- CDH1, px459-CDH1, atau diobati dengan ginsenoside Rd (100  $\mu$ M), dan ditambahkan ke dalam ruang atas. Medium (0,5 mL) dengan 10% serum sapi janin ditambahkan ke ruang bawah. Sampel dikultur pada suhu 37°C di bawah 5% CO<sub>2</sub> selama 48 jam. Akhirnya, mikroskop terbalik digunakan untuk memvisualisasikan sel di ruang bawah setelah difiksasi dengan 4% paraformaldehid. Sel-sel diwarnai dengan pewarna kristal violet 0,1% (Solarbio, Cina). Sel-sel yang diwarnai dihitung menggunakan Image J.

SgRNAs	Urutan (5'→3')	PAM
SgRNA	F:AAGTCACGCTGAATACAGTG R: CACTGTATTCAGCGTGA	GGG
CDH1 Identification	F:GAGAAAGAAATCAGAGCACAAGGAAG R: GTGTTTCAGGCCTTTACCACTCTTCTAC	

Gambar S1- Urutan sgRNA

Genes	Urutan primer (5'→3')
H19	F: TGGTGCACCTTTACAACCACTG R: ATGGTGTCTTTGATGTTGGGGC
miR-675-5p	F:ACACTCCAGCTGGGTGGTGC GGAGAGGGCCC R: CAGTGCGTGTCTGGAGT
CDH1	F: TTCCCAACTCCTCTCCTG R: AAACCTTGCCCTTCTTTGTC

GAPDH	F: TGGTATCGTGGAAGGACTCA R: GGGCCATCGACAGTCTTC
U6	F: GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT R: CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT

Gambar S2- Primer untuk analisis qPCR

10. Uji pembentukan koloni  
Sel SCC9 disemai dalam pelat 60 mm ( $1 \times 10^3$ ) selama dua minggu. Sel-sel difiksasi dengan 4% paraformaldehid dan kemudian diwarnai dengan pewarna kristal violet 0,1% (Solarbio, Cina). Gambar diambil, dan sel dihitung menggunakan Image J.
11. Uji Kit-8 penghitungan sel  
Uji CCK8 (Meilunbio, Cina) digunakan untuk memeriksa viabilitas sel. Sel-sel yang ditransfeksi dengan si-H19, pcDNA3.1-H19, miR-675-5p inhibitor, miR-675-5p mimics, pcDNA3.1-CDH1, px459-CDH1, atau diobati dengan ginsenoside Rd ( $100 \mu\text{M}$ ), diunggulkan ke dalam 96-well plate selama 24 jam. Larutan CCK8 ( $10 \mu\text{L}$ ) kemudian ditambahkan ke setiap sumur, kemudian dikultur pada suhu  $37^\circ \text{C}$  di bawah 5%  $\text{CO}_2$  selama 2 jam. Data dianalisis menggunakan GraphPad.
12. Analisis apoptosis sel  
Sel pertama kali diperlakukan dengan ginsenoside Rd. Sel-sel kemudian dikultur pada suhu  $37^\circ \text{C}$  selama 24 jam di bawah 5%  $\text{CO}_2$ . Kit apoptosis (Beyotime, China) digunakan untuk merawat sel dengan mengikuti petunjuk. Flow cytometry (BD Biosciences, USA) digunakan untuk mengukur apoptosis.
13. Analisis statistik  
Uji-t siswa digunakan untuk menentukan perbedaan antar kelompok. Data dinyatakan sebagai rata-rata  $\pm$  SD. SPSS 16.0 (SPSS Inc., USA) digunakan untuk semua analisis statistik.  $P < 0.05$  menunjukkan signifikansi statistik.

## Hasil

### **Ginsenoside Rd menghambat pertumbuhan, apoptosis, migrasi, dan invasi TSCC**

CCK8 menunjukkan bahwa pertumbuhan sel secara signifikan terhambat ketika SCC9 diperlakukan dengan 100  $\mu$ M ginsenoside Rd. Aktivitas sel berkorelasi negatif dengan konsentrasi ginsenoside Rd. Analisis sitometri aliran menunjukkan bahwa ginsenoside Rd meningkatkan apoptosis SCC9. Uji penyembuhan luka dan Transwell menunjukkan bahwa ginsenoside Rd menghambat migrasi dan invasi SCC9. Uji pembentukan koloni menunjukkan klon SCC9 menurun setelah pengobatan ginsenoside Rd. Selain itu, 100  $\mu$ M Rd menghambat pertumbuhan, migrasi dan invasi sel CAL27, menginduksi apoptosis. Hasil ini menunjukkan bahwa ginsenoside Rd dapat mencegah pertumbuhan, invasi, dan migrasi sel TSCC dan meningkatkan apoptosis.

### **H19 dan miR-675-5p mendorong metastasis TSCC**

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa H19 mendorong metastasis sel kanker, termasuk kanker kolorektal. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan apakah H19 terkait dengan kanker lidah. Hasil qPCR menunjukkan bahwa ekspresi H19 lebih tinggi pada jaringan kanker lidah daripada jaringan normal. Kami mengekspresikan H19 secara berlebihan dan merobohkan H19 di SCC9 untuk analisis lebih lanjut. Dibandingkan dengan kelompok kontrol, ekspresi berlebih H19 meningkatkan kemampuan migrasi SCC9, sementara knockdown H19 menghambat migrasi. Selain itu, ekspresi berlebih H19 meningkatkan kemampuan invasi SCC9, sementara knockdown H19 menghambat invasi. Uji pembentukan koloni menunjukkan bahwa ekspresi berlebih H19 meningkatkan jumlah klon SCC9, sedangkan knockdown H19 menurunkan jumlah klon SCC9. Meskipun ekspresi berlebih H19 tidak secara signifikan mempengaruhi kemampuan pertumbuhan SCC9, knockdown H19 menghambat proliferasi SCC9. Analisis qPCR menunjukkan bahwa ekspresi miR-675-5p lebih tinggi pada jaringan kanker lidah daripada jaringan normal. Selanjutnya, analisis overekspresi

miR-675-5p dan knockdown dilakukan pada SCC9 untuk menilai efeknya pada migrasi, invasi, pertumbuhan, dan jumlah klon. miR-675-5p yang diekspresikan secara berlebihan meningkatkan kemampuan migrasi, invasi, pertumbuhan, dan jumlah klon SCC9. Sebaliknya, knockdown miR-675-5p menurunkan migrasi, invasi, pertumbuhan dan jumlah klon. Hasil ini menunjukkan bahwa H19 dan miR-675-5p dapat meningkatkan metastasis kanker lidah.

### **E-cadherin menghambat metastasis kanker lidah**

E-cadherin mengatur metastasis kanker.<sup>32</sup> Dalam penelitian ini, qPCR menunjukkan bahwa ekspresi CDH1 lebih rendah pada jaringan kanker lidah dibandingkan dengan jaringan lidah normal. Western blotting juga menunjukkan penurunan ekspresi E-cadherin pada jaringan kanker lidah. Oleh karena itu, CDH1 diekspresikan secara berlebihan untuk mempelajari lebih lanjut hubungan antara E-cadherin dan metastasis kanker lidah. Ekspresi berlebih CDH1 menurunkan invasi, migrasi, pertumbuhan dan jumlah klon pada sel kanker lidah. Akhirnya, sistem CRISPR/Cas9 digunakan untuk merobohkan CDH1 untuk menilai lebih lanjut hubungan tersebut. Dibandingkan dengan kelompok kontrol, knockdown CDH1 meningkatkan migrasi, invasi, pertumbuhan dan jumlah klon dari SCC9, menunjukkan bahwa E-cadherin terkait erat dengan metastasis kanker lidah.

### **Mekanisme penghambatan ginsenoside Rd terhadap migrasi dan invasi sel kanker lidah**

Di sini, ekspresi H19 dan miR-675-5p menurun setelah pengobatan ginsenoside Rd. Metode bioinformatika (<https://cm.jefferson.edu/rna22/>) menunjukkan bahwa miR-675-5p secara negatif mengatur CDH1. Selain itu, qPCR menunjukkan bahwa ekspresi CDH1 meningkat. Western blotting juga menunjukkan bahwa ekspresi E-cadherin meningkat setelah pengobatan ginsenoside Rd. Ekspresi berlebih H19 meningkatkan ekspresi miR-675-5p sementara knockdown H19 menurunkan ekspresi miR-675-5p. Ekspresi berlebih H19 juga menurunkan ekspresi CDH1 dan E-cadherin, sementara knockdown H19 meningkatkan ekspresi CDH1

dan E-cadherin. miR-675-5p ekspresi berlebih menurunkan ekspresi CDH1 dan E-cadherin, sementara miR-675-5p knockdown meningkatkan ekspresi CDH1 dan E-cadherin. Ekspresi berlebih dari H19 dan miR-675-5p dapat mengurangi efek pengobatan ginsenoside Rd pada ekspresi CDH1. Hasil ini menunjukkan bahwa ginsenoside Rd mencegah invasi dan migrasi SCC9 melalui sumbu H19 / miR-675-5p / CDH1.

## **Pembahasan**

Ginsenoside Rd adalah ekstrak ginseng dengan efek anti tumor, anti inflamasi, dan perlindungan saraf. Ginsenoside Rd dapat menghambat kanker kolorektal. Namun, hanya sedikit penelitian yang melaporkan efek ginsenoside Rd pada kanker lidah. Dalam penelitian ini, ginsenoside Rd menekan pertumbuhan, invasi dan migrasi SCC9 sementara itu mempromosikan apoptosis. Oleh karena itu, penelitian lebih lanjut harus menilai mekanisme efek penghambatan ginsenoside Rd pada migrasi dan invasi sel kanker lidah. Studi kami menemukan bahwa ginsenoside Rd mengatur ekspresi H19. H19 adalah RNA noncoding panjang yang tidak dapat membentuk protein dan ekspresi embrionik H19 ditekan setelah lahir. H19 terkait dengan banyak jenis kanker. Sebagai contoh, H19 meningkatkan autophagy pada sel kanker payudara yang reseptor estrogen-positif dengan mengurangi metilasi daerah promotor Beclin1 melalui sumbu H19/SAHH/DNMT3B, yang mengarah ke resistensi obat. H19 mendorong perkembangan kanker terutama dengan mempengaruhi fungsi sel, seperti proliferasi sel, anti apoptosis, dan dengan demikian menyebabkan angiogenesis dan pelarian kekebalan.

Dalam penelitian ini, ekspresi H19 tinggi pada kanker lidah dan mendorong invasi dan migrasi sel kanker lidah. Beberapa percobaan sebelumnya mengkonfirmasi bahwa H19 mendorong migrasi dan invasi TSCC, konsisten dengan penelitian ini. Lebih lanjut, miR-675 ditemukan di H19. Peperstraete, dkk. (2020) menemukan bahwa miR-675 dan H19 terlibat dalam migrasi dan invasi kanker secara sendiri atau bersama-sama. Dalam penelitian ini, H19, sebagai RNA fungsional, bertindak sebagai pengatur. Metode bioinformatika menunjukkan bahwa

miR-675-5p memiliki tempat pengikatan untuk mRNA CDH1, yang mempengaruhi ekspresi E-cadherin. Selain itu, ekspresi berlebih dari E-cadherin menghambat migrasi dan invasi sel kanker lidah. Penurunan CDH1 meningkatkan kemampuan migrasi dan invasi sel kanker lidah. Beberapa peneliti menemukan bahwa sampel dengan metastasis kelenjar getah bening memiliki ekspresi E-cadherin yang lebih rendah. Beberapa ahli telah mengkonfirmasi bahwa E-cadherin adalah biomarker yang menjanjikan untuk TSCC.41 Oleh karena itu, H19 / miR-675-5p / CDH1 adalah jalur pensinyalan utama dalam migrasi dan invasi sel kanker lidah.

### **Kesimpulan**

Singkatnya, ginsenoside Rd menghambat migrasi dan invasi sel TSCC. Ginsenoside Rd juga dapat mengatur migrasi dan invasi sel kanker lidah melalui sumbu H19/miR-675-5p/CDH1. Oleh karena itu, penelitian ini menunjukkan bahwa ginsenoside Rd dapat menjadi obat anti-kanker alami. Selain itu, H19 dan CDH1 mungkin merupakan penanda potensial untuk kanker lidah.

### **B. Propolis Polandia dan Efek Biologisnya terhadap Sel Kanker Lidah**

---

Alam, sebagai sumber molekul aktif yang beragam sejak dahulu kala, terus menjadi inspirasi utama dalam pengembangan obat. Aplikasi terapeutik dari produk alami menawarkan peluang besar untuk pengobatan modern, sekaligus menjadi tantangan besar karena masalah prosedur standardisasi dan kompleksitas kimiawi zat-zat ini. Di sisi lain, kompleksitas tersebut tidak dapat dihindari dan efek terapeutik akhir dari keseluruhan ekstrak pada umumnya lebih baik daripada efek dari senyawa individu karena dihasilkan dari aktivitas sinergis komponen ekstrak.

Salah satu produk alami yang paling menarik adalah propolis, yaitu zat resin yang dikumpulkan oleh lebah dari tanaman dan dicampur dengan lilin dan enzim. Kemudian digunakan untuk memperkuat dan melindungi sarang mereka serta mencegah pembusukan bangkai penyusup. Orang-

orang juga telah banyak menggunakan propolis dalam pengobatan tradisional, karena dikenal memiliki spektrum yang luas dari sifat biologis termasuk antibakteri, antijamur, antivirus, antiinflamasi, antioksidan, dan aktivitas antikanker. Saat ini, propolis digunakan dalam industri kosmetik, yaitu sebagai komponen krim anti jerawat dan produk untuk kebersihan mulut. Namun, potensi terapeutik propolis masih belum dimanfaatkan dan banyak kelompok peneliti melanjutkan penyelidikan komposisi kimia dan sifat biologis bahan ini. Penelitian-penelitian tersebut mengungkapkan adanya variabilitas dalam komposisi propolis yang bergantung pada wilayah geografis pengambilan dan sumber tanaman. Sebagai contoh, eksudat kuncup dari kuncup poplar yang berbeda merupakan sumber utama propolis yang dikumpulkan di zona beriklim sedang, termasuk Eropa. Silva-Carvalho *et al.* melaporkan bahwa propolis poplar terutama terdiri dari flavonoid, asam fenolik, dan esternya.

Secara khusus, pengobatan mulut kontemporer dapat mengambil manfaat dari spektrum yang luas dari aktivitas propolis. Banyak spesialisasi kedokteran gigi yang memanfaatkan produk alami ini telah dilaporkan. Penelitian tentang propolis Polandia terutama difokuskan pada sifat antimikrobanya. Menariknya, sejauh ini belum ada penelitian tentang penggunaan propolis Polandia untuk melawan kanker mulut yang dipublikasikan. Hanya ada sedikit penelitian mengenai efek antiproliferasi propolis Polandia pada sel glioblastoma, sel kanker usus besar, paru-paru dan payudara, serta sel kanker prostat. Di sisi lain, dengan mempertimbangkan data global, masalah pengobatan kanker mulut masih belum terpecahkan. Pada tahun 2018, kasus baru kanker mulut terjadi secara global pada sekitar 355.000 orang dan menyebabkan 177.000 kematian. Jenis kanker mulut yang paling umum adalah karsinoma sel skuamosa lidah (TSCC), yang ditandai dengan metastasis limfatik yang tinggi, kekambuhan, dan resistensi terhadap obat. Pendekatan pengobatan saat ini meliputi pembedahan, yang dapat diikuti dengan radioterapi dan/atau kemoterapi. Namun, masih belum ada strategi terapi yang efektif dan angka kematian yang terkait dengan penyakit ini masih terus meningkat.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi sifat antikanker dari tiga jenis propolis yang berbeda dari berbagai daerah di Polandia pada model *in vitro* sel kanker lidah. Untuk alasan ini, ekstrak etanol, etanol-heksana, heksana, dan heksana-etanol dari propolis Polandia disiapkan. Fibroblas gingiva manusia normal digunakan sebagai kelompok kontrol sel non-kanker dan garis sel mirip makrofag murin digunakan untuk mengevaluasi potensi anti-inflamasi dari produk yang disiapkan. Selain itu, komposisi kimia dan aktivitas antioksidan dari ekstrak yang dibuat juga dibandingkan.

## **Hasil**

### **Rendemen Ekstraksi**

Rendemen ekstraksi dari ekstrak propolis dihitung dan disajikan pada Tabel 1. Nilai rendemen ekstrak etanol propolis (EEP) lebih tinggi daripada ekstrak n-heksana propolis (HEP) dan nilai rendemen tertinggi diperoleh untuk propolis dari Masovia (P2) dan Provinsi Pomerania Barat (P3). Oleh karena itu, hasil penelitian menunjukkan bahwa etanol merupakan pelarut yang lebih baik daripada n-heksana. Selain itu, ekstrak heksana-etanol propolis (HEEP) memiliki hasil ekstraksi tertinggi kedua di antara semua ekstrak propolis yang dianalisis.

### **Kandungan Polifenol Total**

Kandungan polifenol total (TPC) ditentukan dengan metode Folin-Ciocalteu (Tabel 2). Analisis statistik menunjukkan bahwa tidak ada variasi yang kuat antara TPC semua propolis yang dipanen di berbagai provinsi di Polandia ( $F(2, 109) = 0,86794$ ;  $p = 0,42270$ ). Namun, terlepas dari jenis propolis, terdapat perbedaan TPC yang signifikan secara statistik ( $F(3, 108) = 1178,4$ ;  $p = 0,0000$ ) antara ekstrak yang berbeda, seperti ekstrak etanol propolis (EEP), ekstrak etanol-heksana propolis (EHEP), ekstrak heksana propolis (HEP), dan ekstrak etanol-etanol propolis (HEEP). TPC untuk EEP dan HEEP berada di atas 220 mg GAE (setara asam galat)/g ekstrak propolis, sedangkan TPC untuk EHEP dan HEP berada di bawah 50 mg GAE/g. Uji post-hoc Tukey menunjukkan bahwa semua perbedaan TPC antara setiap jenis ekstrak propolis yang diuji signifikan

secara statistik pada  $p < 0,05$ . Menariknya, ketika hanya EEP dan HEEP yang dipertimbangkan, perbedaan yang kuat di antara TPC propolis yang dipanen di berbagai provinsi diamati ( $F(2, 51) = 31,058$ ;  $p = 0,00000$ ). Dengan demikian, ekstrak propolis dari Provinsi Pomerania Barat (P3) memiliki TPC tertinggi, sedangkan TPC terendah diperoleh untuk ekstrak propolis dari Podlasie (P1).

**Tabel 1.** Hasil ekstraksi dari ekstrak yang disiapkan; P1-propolis dari Podlasie, P2-propolis dari Masovia, P3-propolis dari Provinsi Pomerania Barat, EEP-ekstrak etanol propolis, EHEP-ekstrak etanol-heksana propolis, HEP-ekstrak etanol propolis, HEEP-ekstrak etanol-etanol propolis.

Simbol	Urutan Pelarut	Hasil Ekstraksi [%]		
		P1	P2	P3
EEP	ethanol	33.4	57.5	63.7
EHEP	ethanol-hexane	24.2	8.4	13.3
HEP	hexane	28.2	17.5	14.5
HEEP	hexane-ethanol	32.9	42.7	47.9

**Tabel 2.** Kandungan total polifenol dan kandungan total flavonoid dari ekstrak yang disiapkan; hasil dinyatakan sebagai rata-rata  $\pm$  SD; P1-propolis dari Podlasie, P2-propolis dari Masovia, P3-propolis dari Provinsi Pomerania Barat, EEP-ekstrak propolis etanol, EHEP-ekstrak propolis etanol-heksana, HEP-ekstrak propolis heksana, HEEP-ekstrak propolis heksana-etanol, GAE-setara asam galat, QE-setara kuersetin.

Ekstrak Propolis	P1	P2	P3
<b>Kandungan Total Polifenol [mg GAE/g]</b>			
EEP	222.05 $\pm$ 14.29	259.63 $\pm$ 11.73	275.79 $\pm$ 13.42
EHEP	16.36 $\pm$ 1.12	19.60 $\pm$ 1.07	18.02 $\pm$ 1.09
HEP	20.45 $\pm$ 4.08	45.02 $\pm$ 7.22	38.84 $\pm$ 6.40
HEEP	249.92 $\pm$ 8.64	277.19 $\pm$ 14.28	308.92 $\pm$ 15.85
<b>Kandungan Total Flavonoid [mg QE/g]</b>			
EEP	18.76 $\pm$ 0.66	22.19 $\pm$ 0.44	19.79 $\pm$ 0.19
EHEP	11.10 $\pm$ 0.06	10.87 $\pm$ 0.03	12.99 $\pm$ 0.07
HEP	12.23 $\pm$ 0.21	13.49 $\pm$ 0.13	14.45 $\pm$ 0.19
HEEP	19.00 $\pm$ 0.57	22.46 $\pm$ 0.40	21.63 $\pm$ 0.25

### **Kandungan Total Flavonoid (TFC)**

Kandungan Total Flavonoid (TFC), yang dievaluasi melalui metode aluminium klorida, disajikan dalam Tabel 2. Serupa dengan hasil pengukuran TPC, analisis ini juga menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan secara statistik di antara propolis dari asal yang berbeda ( $F(2, 133) = 3,3270$ ;  $p = 0,03891$ ). Di sisi lain, perbedaan di antara berbagai ekstrak—EEP, EHEP, HEP dan HEEP—secara statistik signifikan ( $F(3, 132) = 360,77$ ;  $p = 0,0000$ ). Uji post-hoc Tukey mengungkapkan bahwa semua perbedaan TFC antara setiap jenis ekstrak yang diuji secara statistik signifikan pada  $p < 0,05$ , kecuali untuk perbedaan antara sampel EEP dan HEEP ( $p = 0,122385$ ). Untuk semua ekstrak etanol dan heksana-etanol (EEP dan HEEP) yang dianalisis, TFC berada di atas 18,76 mg QE (setara kuersetin)/g ekstrak propolis, sementara ekstrak etanol-heksana dan heksana (EHEP dan HEP) dicirikan dengan TFC yang lebih rendah secara signifikan. TFC tertinggi di antara semua sampel yang diuji ditemukan pada ekstrak propolis dari Masovia (EEP\_P2 dan HEEP\_P2).

### **Analisis GC-MS**

Komposisi kimia EEP dari berbagai wilayah Polandia (Podlasie, Masovia dan Provinsi Pomerania Barat) ditentukan menggunakan kromatografi gas-spektrometri massa (GC-MS) dan disajikan dalam Lampiran A, Tabel A1. Secara singkat, analisis EEP mengungkapkan adanya tujuh puluh dua komponen, di mana enam puluh dua di antaranya teridentifikasi. Komponen utama dari analisis material adalah turunan TMS dari asam 4-kumarat, d-fruktosa, d-glukosa, d-mannopiranos, asam benzoat, asam lignoserat, asam ferulat dan naringenin.

Analisis GC-MS dari ekstrak etanol propolis dari Podlasie (EEP\_P1) dan Masovia (EEP\_P2) menunjukkan konsentrasi asam aromatik yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak etanol propolis dari Provinsi Pomerania Barat (EEP\_P3). Konsentrasi senyawa yang dipilih disajikan dalam Tabel A1. Hasil menunjukkan bahwa konsentrasi tertinggi asam 4-kumarat dan asam kafeat diukur dalam EEP\_P2, sementara yang terendah ditemukan dalam EEP\_P3. Selanjutnya, konsentrasi tertinggi asam ferulat dan asam

benzoat diukur dalam EEP\_P1, sementara yang terendah ditemukan dalam EEP\_P3.

Komposisi kimia HEP dari berbagai wilayah Polandia disajikan dalam Lampiran A, Tabel A2. Profil senyawa dari ekstrak n-heksana propolis, yang ditentukan oleh GC-MS, mengandung empat puluh satu senyawa (di mana empat puluh di antaranya teridentifikasi). Hasil menunjukkan dominasi lilin dan turunan asam lemak TMS. Senyawa utama dari HEP\_P1 dan HEP\_P2 adalah metil triakontil eter, heptakosan, pentakosan dan asam lignoserat. Senyawa utama dari HEP\_P3 adalah heptakosan, asam lignoserat, asam 13-oktadekanoat dan metil triakontil eter. Selain itu, HEP mengandung sekitar dua kali lebih banyak (HEP\_P1: 8,10%, HEP\_P2: 8,47%) atau empat kali lebih banyak (HEP\_P3: 13,19%) asam benzoat dibandingkan EEP.

Komposisi kimia HEEP yang dipanen dari berbagai wilayah Polandia disajikan dalam Lampiran A, Tabel A3. Profil senyawa dari ekstrak heksana-etanol propolis mengandung enam puluh lima senyawa (di mana enam puluh dua di antaranya teridentifikasi). Kesamaan tinggi dari kandungan EEP dan HEEP diamati. Senyawa dominan dalam HEEP adalah asam 4-kumarat, d-fruktosa, d-glukosa, d-mannopiranos dan asam ferulat.

#### Komposisi Asam Lemak

Komposisi kimia lengkap asam lemak dalam HEP dari berbagai wilayah Polandia disajikan dalam Lampiran A, Tabel A4. Empat belas senyawa teridentifikasi saat menganalisis asam lemak yang terkandung dalam propolis dari asal yang berbeda. Komponen utama yang ditemukan dalam fraksi HEP adalah: metil ester asam heksadekanoat, metil ester asam heptadekanoat, metil ester asam oleat dan metil ester asam tetrakosanoat.

#### **Aktivitas Penangkapan Radikal Bebas DPPH**

Uji 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan dari ekstrak propolis. Semua ekstrak etanol-heksana dan heksana yang diuji (EHEP dan HEP) yang diperoleh dari propolis yang dipanen di berbagai wilayah Polandia (P1, P2, P3) hanya memiliki

aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH yang minimal dibandingkan dengan standar. Oleh karena itu, ekstrak-ekstrak tersebut dianggap tidak memiliki efek sama sekali.

Sebaliknya, untuk EEP dan HEEP, aktivitas penangkapan radikal bebas meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak dari 0 hingga 200 µg/mL. Untuk ekstrak aktif ini,  $IC_{50}$  mereka dihitung (konsentrasi ekstrak yang menghambat pembentukan radikal bebas DPPH sebesar 50%) dan ditunjukkan dalam Tabel 3. Perbedaan yang signifikan secara statistik di antara  $IC_{50}$  propolis dari berbagai wilayah Polandia telah didemonstrasikan ( $F(2, 55) = 43,365$ ;  $p = 0,00000$ ).

Uji post-hoc Tukey mengungkapkan bahwa semua perbedaan  $IC_{50}$  antara setiap jenis propolis yang diuji (P1, P2, P3) secara statistik signifikan pada  $p < 0,05$ . Terlepas dari jenis propolis yang diteliti, jenis ekstrak tidak secara signifikan mempengaruhi nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh ( $F(1, 56) = 0,09896$ ;  $p = 0,75425$ ). Nilai  $IC_{50}$  terendah dihitung untuk ekstrak propolis dari Provinsi Pomerania Barat (P3), menunjukkan potensi antioksidan tertinggi dari preparasi ini di antara semua ekstrak yang diuji.

**Tabel 3.** Konsentrasi ekstrak yang menghambat pembentukan radikal bebas DPPH sebesar 50% ( $IC_{50}$ ); P1—propolis dari Podlasie, P2—propolis dari Masovia, P3—propolis dari Provinsi Pomerania Barat, EEP—ekstrak propolis dalam etanol, HEEP—ekstrak propolis dalam heksana-etanol.

Ekstrak Propolis	$IC_{50}$ [µg/mL]		
	P1	P2	P3
EEP	78.02 ± 4.86	55.07 ± 7.39	33.01 ± 2.73
HEEP	62.84 ± 14.59	60.72 ± 2.89	40.92 ± 7.55

### Aktivitas Antikanker

Aktivitas antikanker dari ekstrak propolis Polandia yang dipilih dievaluasi pada karsinoma sel skuamosa manusia yang berasal dari lidah (SCC-25) setelah inkubasi selama 5 menit dan 24 jam. Untuk tujuan ini, dilakukan uji 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromida (uji MTT) dan uji sulforhodamin B (uji SRB). Selain itu, untuk kedua metode

tersebut, inkubasi selama 24 jam dengan fibroblas gingiva manusia (HGF) digunakan sebagai model kontrol untuk menyelidiki efek propolis pada sel normal, yaitu sel non-kanker. Nilai sitotoksitas EEP dan HEEP yang diambil dari tiga wilayah berbeda di Polandia dan diterapkan pada tiga konsentrasi (100, 500, dan 1000 µg/mL) disajikan dalam hasil uji MTT dan dalam hasil uji SRB.

### Uji MTT

Ketika dilakukan inkubasi selama 5 menit dengan ekstrak propolis, aktivitas mitokondria sel SCC-25 hanya sedikit berkurang. Selain itu, ketika konsentrasi semua ekstrak yang diuji ditingkatkan, aktivitas mitokondria masih di atas 80% dibandingkan dengan kontrol. Namun, periode inkubasi yang diperpanjang selama 24 jam secara signifikan memengaruhi viabilitas sel. Analisis ANOVA tiga arah menunjukkan bahwa untuk semua ekstrak propolis Polandia yang diuji, perbedaan antara kelompok berdasarkan jenis propolis atau jenis ekstraksi tidak signifikan secara statistik ( $p = 0,093920$  dan  $p = 0,493920$ , masing-masing). Satu-satunya faktor yang menentukan perbedaan signifikan antar kelompok adalah konsentrasi ekstrak ( $p = 0,000000$ ). Untuk sel kanker lidah, inkubasi dengan masing-masing ekstrak propolis yang diuji pada konsentrasi 500 dan 1000 µg/mL menghasilkan penurunan aktivitas mitokondria menjadi sekitar 20% dari kontrol. Ketika konsentrasi ekstrak propolis yang diterapkan adalah 100 µg/mL, aktivitas mitokondria paling berkurang untuk EEP\_P3 (33% dari kontrol) dan paling sedikit berkurang untuk EEP\_P1 (59% dari kontrol), sehingga EEP\_P1 kurang aktif. Hasil yang diperoleh untuk HGF yang diobati dengan propolis menunjukkan bahwa ekstrak propolis yang diuji juga memengaruhi viabilitas sel normal. Inkubasi HGF dengan masing-masing ekstrak propolis yang diuji pada konsentrasi 500 dan 1000 µg/mL mengurangi aktivitas mitokondria menjadi sekitar 40% dibandingkan dengan kontrol. Selain itu, ketika konsentrasi ekstrak propolis 100 µg/mL diterapkan, EEP\_P3 adalah ekstrak propolis yang paling aktif, yang mengurangi aktivitas mitokondria menjadi 52% dari kontrol. Selanjutnya, HEEP\_P2 mengurangi aktivitas mitokondria menjadi 76% dibandingkan

dengan kontrol, sehingga menjadi ekstrak propolis yang paling tidak aktif. Hasil ANOVA tiga arah untuk HGF mengungkapkan bahwa semua faktor yang diteliti (jenis propolis, jenis ekstrak, dan konsentrasi ekstrak) merupakan sumber variasi signifikan dengan  $p < 0,05$ .

### **Uji SRB**

Ketika sel SCC-25 diinkubasi dengan propolis Polandia selama 5 menit, untuk semua konsentrasi dari semua ekstrak yang diuji, total kandungan protein sel berada di atas 93% dibandingkan dengan kontrol. Oleh karena itu, tidak ditemukan efek sitotoksik dari ekstrak propolis setelah inkubasi singkat. Namun, inkubasi yang diperpanjang, yaitu selama 24 jam, secara signifikan memengaruhi proliferasi sel. Hasil menunjukkan bahwa inkubasi sel kanker lidah selama 24 jam dengan konsentrasi ekstrak propolis yang meningkat mengakibatkan penurunan total kandungan protein. Sebagai contoh, ketika konsentrasi 100 dan 500  $\mu\text{g/mL}$  dari semua ekstrak propolis Polandia diterapkan, kandungan protein sel berkurang menjadi sekitar 55% dari kontrol. Secara khusus, aktivitas terendah diamati pada 100  $\mu\text{g/mL}$  EEP\_P1, yang mengurangi kandungan protein sel menjadi 72% dibandingkan dengan kontrol. Namun, untuk 500  $\mu\text{g/mL}$  HEEP\_P1, kandungan protein sel berkurang menjadi 45% dari kontrol. Akhirnya, ketika sel kanker lidah diinkubasi dengan masing-masing ekstrak propolis Polandia yang diuji pada konsentrasi 1000  $\mu\text{g/mL}$ , hasilnya adalah penurunan total kandungan protein menjadi sekitar 45% dibandingkan dengan kontrol. Hasil untuk HGF menunjukkan bahwa ekstrak propolis yang dianalisis pada konsentrasi 500 dan 1000  $\mu\text{g/mL}$  mengganggu proliferasi sel normal. Inkubasi HGF dengan ekstrak propolis 1000  $\mu\text{g/mL}$  mengurangi total kandungan protein menjadi sekitar 30% dibandingkan dengan kontrol. Inkubasi HGF dengan 1000  $\mu\text{g/mL}$  HEEP\_P2 menghasilkan tingkat kandungan protein terendah, yaitu berkurang menjadi 20% dari kontrol. Di sisi lain, inkubasi HGF dengan 1000  $\mu\text{g/mL}$  EEP\_P1 menghasilkan tingkat total kandungan protein tertinggi, yaitu 40% dari kontrol. Selain itu, inkubasi HGF dengan ekstrak propolis 500  $\mu\text{g/mL}$  juga menginduksi sitotoksitas yang signifikan. Sebaliknya,

untuk konsentrasi 100 µg/mL, tingkat total kandungan protein terendah, yaitu 79% dari kontrol, diamati ketika HGF diinkubasi dengan EEP\_P3 dan HEEP\_P3. Hasil ANOVA tiga arah untuk baik SCC-25 maupun HGF mengungkapkan bahwa semua faktor yang diteliti (jenis propolis, jenis ekstrak, dan konsentrasi ekstrak) merupakan sumber variasi signifikan dengan  $p < 0,05$ .

### **Potensi Anti-Inflamasi**

Potensi anti-inflamasi dari ekstrak propolis yang dipilih dievaluasi pada garis sel makrofag mirip tikus (P388-D1) melalui uji MTT dan uji SRB setelah inkubasi selama 24 jam. Untuk semua konsentrasi yang dianalisis dari semua ekstrak yang diuji, terlihat bahwa periode inkubasi yang diperpanjang selama 24 jam secara signifikan memengaruhi aktivitas mitokondria dan proliferasi sel. Inkubasi dengan masing-masing ekstrak propolis yang diuji pada konsentrasi 1000 µg/mL mengakibatkan penurunan aktivitas mitokondria sel P388-D1 menjadi sekitar 19% dari kontrol dan penurunan total kandungan protein menjadi sekitar 38% dari kontrol. Ketika konsentrasi terendah dari ekstrak (100 µg/mL) diterapkan, aktivitas mitokondria sel berkurang menjadi 48% dan kandungan protein sel menjadi sekitar 55% dari kontrol.

### **Diskusi**

Propolis menunjukkan aktivitas antiproliferatif pada berbagai garis sel kanker. Dilaporkan bahwa produk alami ini dapat memblokir jalur sinyal onkogen tertentu, yang mengarah pada penurunan proliferasi sel. Propolis juga dapat meningkatkan apoptosis, memberikan efek antiangiogenik, dan memodulasi mikro lingkungan tumor.

Meskipun memiliki sifat menguntungkan ini, penelitian tentang aktivitas antikanker propolis terhadap sel kanker lidah manusia masih sangat terbatas. Aktivitas antiproliferatif dari ekstrak etanol propolis Chili terhadap sel karsinoma epitel mulut manusia (KB) telah ditunjukkan oleh Russo *et al.* Selanjutnya, Yen *et al.* dan Chiu *et al.* menunjukkan efek anti-inflamasi dari berbagai ekstrak propolis dengan menghambat

salah satu penanda inflamasi—COX-2—pada garis sel KB. Penelitian oleh Salehi *et al.* menentukan efek kemopreventif propolis Iran pada perubahan displastik pada epitel lidah tikus setelah pemberian karsinogen (DMBA). Hasil menunjukkan bahwa propolis dapat mencegah displasia mukosa mulut yang diinduksi DMBA pada model hewan. Efek serupa juga diperoleh untuk ekstrak hidroalkohol propolis merah Brasil (HERP) terhadap karsinoma sel skuamosa oral (OSCC) pada rodent. Penelitian tersebut mengungkapkan bahwa HERP menghambat pertumbuhan dan progresi tumor.

Efek antikanker propolis sering kali dikaitkan dengan salah satu komponen aktifnya—ester fenil kafeat (CAPE). Ini dapat dianggap sebagai dukungan potensial untuk terapi pasien dengan karsinoma sel skuamosa oral karena kemampuannya untuk menghambat proliferasi sel dan mencegah metastasis kanker. Di sisi lain, pendekatan lain untuk memahami mekanisme aksi obat alami lebih komprehensif dan mempertimbangkan kompleksitas produk tersebut daripada hanya efek dari komponen individualnya. Penelitian oleh Czyżewska *et al.* menunjukkan bahwa efek sinergis dari berbagai polifenol (krisin, galangin, pinokembrin, asam kafeat, asam p-kumaric, dan asam ferulat) bertanggung jawab atas kemampuan propolis untuk menghambat pertumbuhan sel kanker lidah manusia melalui apoptosis. Studi lain menunjukkan efek sinergis dari komponen utama propolis Iran pada sel karsinoma epitel mulut (KB). Uji MTT mengungkapkan bahwa nilai  $IC_{50}$  dari EEP dan komponen utamanya, kuersetin (Q), masing-masing adalah 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dan 195  $\mu\text{g}/\text{mL}$  setelah 48 jam inkubasi.

Dalam studi ini, ekstrak total propolis Polandia dievaluasi dalam hal selektivitas efek antikankernya pada sel kanker lidah dibandingkan dengan fibroblas gingiva normal. Analisis kimia mengungkapkan bahwa ekstraksi menggunakan etanol dan heksana-etanol adalah metode yang paling efektif untuk memperoleh produk propolis yang paling kompleks secara kimia. Kesimpulan ini mengonfirmasi temuan studi lain yang menunjukkan ekstraksi etanol sebagai metode yang paling umum dalam

pengolahan propolis mentah. Metode kedua yang diusulkan—ekstraksi etanol-heksana—dapat menjadi alternatif menarik yang memungkinkan penghilangan kandungan lilin.

Baik metode spektroskopi maupun kromatografi memungkinkan penentuan karakter kimia dari ekstrak yang diperoleh. Senyawa kimia yang teridentifikasi dalam ekstrak propolis yang disiapkan sejalan dengan hasil yang dijelaskan oleh Şahinler dan Kaftanoğlu serta oleh Anjum *et al.*, yang menunjukkan konsentrasi tinggi asam aromatik, hidrokarbon, alkohol, polifenol, dan asam lemak. Kehadiran senyawa fenolik dalam ekstrak propolis sangat menjanjikan ketika mempertimbangkan aktivitas antikankernya.

Analisis biologis dari sistem yang dipilih menunjukkan bahwa inkubasi sel yang diperpanjang selama 24 jam dengan propolis secara signifikan memengaruhi viabilitas sel yang diukur melalui uji MTT dan SRB. Perbedaan antara kelompok, berdasarkan jenis propolis atau jenis ekstraksi, tidak signifikan secara statistik. Ini dapat mengonfirmasi hipotesis bahwa perbedaan dalam komposisi kimia dari ekstrak yang diperoleh tidak memengaruhi efek biologis umum yang diinduksi oleh mereka. Perlu ditekankan bahwa konsentrasi ekstrak propolis yang lebih tinggi (500 dan 1000 µg/mL) juga secara signifikan memengaruhi viabilitas HGFs normal. Oleh karena itu, hanya konsentrasi ekstrak sebesar 100 µg/mL yang dapat dianggap efektif secara selektif pada sel kanker. Hasil serupa yang menunjukkan efek sitotoksik propolis pada fibroblas manusia normal diperoleh oleh Tyszka-Czochara *et al.*, Popova *et al.*, dan dalam studi sebelumnya. Lebih lanjut, studi yang disajikan oleh Popova *et al.* mengungkapkan profil kimia serupa dari sampel propolis (terutama flavanon dan dihidroflavonol, serta serangkaian ester asam p-kumaric, asam ferulat, asam benzoat, dan asam lemak (asam palmitat, asam linoleat, asam oleat)) dibandingkan dengan ekstrak yang dianalisis dalam studi kami.

Selain itu, karena kandungan polifenol propolis, aktivitas anti-inflamasi dari ekstrak yang disiapkan diverifikasi pada model makrofag

yang umum digunakan dalam kasus senyawa alami. Szliszka *et al.* menyarankan bahwa senyawa fenolik dapat bertanggung jawab atas kontribusi penting dari propolis hijau Brasil dalam modulasi inflamasi yang dimediasi oleh kemokin. Dalam studi kami, gangguan proliferasi sel dan aktivitas mitokondria yang diamati pada garis sel mirip makrofag (P388-D1) menunjukkan kemungkinan aktivitas anti-inflamasi dari ekstrak yang disiapkan. Di sini kami mengamati bahwa efek tersebut tergantung pada efek sitotoksik dari ekstrak propolis yang diterapkan.

Di masa depan, hasil awal yang dilaporkan dalam penelitian ini seharusnya digunakan untuk memilih ekstraksi etanol dan heksana-etanol sebagai metode paling efektif dalam ekstraksi propolis untuk memperoleh produk yang kompleks secara kimia dan aktif secara biologis. Ekstrak yang disiapkan seharusnya menjadi subjek analisis mendalam yang bertujuan untuk mengidentifikasi komponen paling aktif dan menyelidiki mekanisme molekuler yang tepat dari aksi antikanker dan anti-inflamasi mereka. Selain itu, ekstrak alami yang dipilih dapat dikombinasikan dengan rejimen kemoterapi konvensional untuk mengusulkan perawatan kanker yang lebih aman dan lebih efektif. Terakhir, mikropartikel polimer fungsional untuk enkapsulasi senyawa aktif biologis dapat dirancang dan diproduksi.

## **Bahan dan Metode**

### **Bahan**

Bahan penelitian adalah sampel propolis yang berasal dari tiga daerah berbeda di Polandia (Tabel 4). Propolis mentah dikumpulkan dari sarang lebah secara manual. Sebelum diproses, propolis disimpan pada suhu kamar dalam kondisi gelap.

**Tabel 4.** Asal geografis propolis Polandia yang diuji.

Simbol	Daerah Asal	Tanaman Paling Melimpah di Wilayah tersebut	Spesies Lebah
P1	Podlasie (Hajnówka)	spruce ( <i>Picea abies</i> L.)—30%, pine ( <i>Pinus sylvestris</i> L.)— 27%, alder ( <i>Alnus glutinosa</i> L.)—20%, sessile oak ( <i>Quercus</i> <i>petraea</i> L.)—10%, silver birch ( <i>Betula pendula</i> L.)—7%	<i>Apis mellifera</i> <i>carnica</i> x <i>Apis mellifera</i> <i>caucasica</i>
P2	Mazovia (Ciechanów)	pine ( <i>Pinus sylvestris</i> L.)— 70%, alder ( <i>Alnus glutinosa</i> L.)—10%, sessile oak ( <i>Quercus</i> <i>petraea</i> L.)—10%, silver birch ( <i>Betula pendula</i> L.)—7%	<i>Apis mellifera</i> <i>carnica</i>
P3	West Pomerania (Miedzyzdroje)	pine ( <i>Pinus sylvestris</i> L.)—75%, alder ( <i>Alnus glutinosa</i> L.)—5%, beech ( <i>Fagus sylvatica</i> L.)—5%, sessile oak ( <i>Quercus petraea</i> L.)—5%, silver birch ( <i>Betula</i> <i>pendula</i> L.)—4%	<i>Apis mellifera</i> <i>mellifera</i>

### Ekstraksi

Ekstraksi propolis Polandia dilakukan dengan menggunakan etanol, etanol-heksana, heksana, dan heksana-etanol. Untuk tujuan ini, 5 g propolis mentah dipotong menjadi bagian kecil, dilarutkan dalam 50 mL etanol 70% (POCH, Polandia) atau 50 mL heksana (POCH, Polandia), dan diaduk selama 48 jam pada suhu kamar dalam kondisi gelap, menggunakan pengaduk magnetik (Big-squid, IKA, Jerman). Selanjutnya, sampel disentrifugasi pada 10.500 rpm selama 10 menit pada suhu kamar, menggunakan sentrifus 5804 (Eppendorf, Jerman). Supernatan yang diperoleh dinamakan ekstrak etanol propolis (EEP) dan ekstrak heksana propolis (HEP). Kemudian, residu diekstraksi sekali lagi dengan etanol atau heksana untuk memperoleh EEP\_II atau HEP\_II, masing-masing. Selanjutnya, residu yang tersisa setelah ekstraksi etanol diperlakukan dua kali dengan heksana untuk memperoleh ekstrak etanol-heksana (EHEP dan EHEP\_II). Residu yang tersisa setelah ekstraksi heksana dilarutkan

dua kali dengan etanol 70% untuk memperoleh ekstrak heksana-etanol (HEEP dan HEEP\_II). Residu yang tidak terlarut dibuang.

Ekstrak tersebut diuapkan hingga kering pada suhu 40 °C menggunakan evaporator vakum rotari RV 10 (IKA, Jerman) dan disimpan pada suhu 4 °C dalam kondisi gelap. Setelah penguapan, sampel yang diperoleh ditimbang menggunakan timbangan analitik: WPS 510/C/2 (Radwag, Polandia); hasil ekstraksi dinyatakan dalam persentase sebagai rasio antara massa sampel setelah penguapan dengan massa bahan propolis sebelum ekstraksi. Sampel yang diperoleh setelah ekstraksi kedua dengan pelarut yang sama (EEP\_II, HEP\_II, EHEP\_II, HEEP\_II) tidak dianalisis lebih lanjut karena jumlahnya yang kecil. Kemudian, sampel tersebut dilarutkan dalam metanol (POCH, Polandia) dengan konsentrasi 1 mg/mL (untuk studi kimia) atau dalam DMSO (POCH, Polandia) dengan konsentrasi 100 mg/mL (untuk studi biologis).

### **Kandungan Total Polifenol**

Kandungan senyawa fenolik terlarut total dalam sampel ditentukan menggunakan metode kolorimetri Folin–Ciocalteu. Untuk analisis ini, 100 µL ekstrak propolis yang dianalisis dilarutkan dalam metanol pada konsentrasi 1 mg/mL. Larutan ini kemudian dicampur dengan 900 µL air distilasi dan 100 µL reagen fenol Folin dan Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Polandia). Setelah inkubasi selama 5 menit, 1 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7% (POCH, Polandia) dan 400 µL air distilasi ditambahkan ke dalam campuran. Campuran tersebut diinkubasi selama 2 jam, dan absorbansi diukur pada 765 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (SP 8001, Metertech, Norwegia). Asam galat (Sigma-Aldrich, Polandia) digunakan sebagai standar untuk kalibrasi. Hasilnya dinyatakan sebagai mg setara asam galat per gram ekstrak propolis (mg GAE/g), dengan minimum sembilan pengukuran dilakukan untuk setiap ekstrak.

### **Kandungan Total Flavonoid**

Kandungan total flavonoid dalam sampel ditentukan menggunakan metode klorida aluminium. Secara singkat, 100 µL ekstrak propolis yang

dilarutkan dalam metanol (1 mg/mL) dicampur dengan 100  $\mu$ L  $\text{AlCl}_3$  2% (Sigma-Aldrich, Polandia). Setelah diinkubasi selama 15 menit, absorbansi diukur pada 435 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (SP 8001, Metertech, Norwegia). Kuersetin (Sigma-Aldrich, Polandia) digunakan sebagai standar. Hasilnya dinyatakan sebagai mg setara kuersetin per gram ekstrak propolis (mg QE/g), dengan minimum sembilan pengukuran dilakukan untuk setiap ekstrak.

### **Analisis GC-MS**

Ekstrak propolis yang diperoleh (EEP, HEP, dan HEEP) dievaluasi dalam hal kandungan senyawa berbobot molekul rendah melalui derivatisasi menggunakan pendekatan silylasi N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) pada kromatografi gas yang dikombinasikan dengan spektrometri massa (Shimadzu GC-MS QP 2020, Shimadzu, Kyoto, Jepang). Setiap ekstrak diuapkan di bawah tekanan rendah. Kemudian, 500  $\mu$ L piridina dan 50  $\mu$ L BSTFA ditambahkan ke semua sampel. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam vial dan dipanaskan selama 15 menit pada suhu 70 °C. Pemisahan dilakukan menggunakan kolom kapiler Zebron ZB-5 dengan panjang 30 m, diameter dalam 0,25 mm, dan ketebalan film 0,25  $\mu$ m (Phenomenex, Torrance, CA, AS). Analisis GC-MS dilakukan sesuai dengan parameter berikut: mode pemindaian dengan rentang massa dari 40 hingga 1050 m/z dalam mode dampak elektronik (EI) pada 70 eV; mode pemindaian 10 scan  $\text{s}^{-1}$ . Analisis dilakukan dengan menggunakan helium sebagai gas pembawa pada laju aliran 1,0 mL  $\text{menit}^{-1}$  dalam rasio split 1:20 dan program berikut: (a) 100 °C selama 1 menit; (b) laju 2,0 °C  $\text{menit}^{-1}$  dari 100 hingga 190 °C; (c) laju 5 °C  $\text{menit}^{-1}$  dari 190 hingga 300 °C. Injector diatur pada suhu 280 °C. Senyawa-senyawa diidentifikasi dengan menggunakan dua metode analitis yang berbeda, yaitu membandingkan waktu retensi dengan bahan kimia otentik (Standar Alkan Saturasi Supelco C7-C40) dan spektrum massa yang diperoleh dengan data pustaka yang tersedia (Willey NIST 17, indeks kecocokan >90%).

### **Komposisi Asam Lemak**

Fraksi lipid diperoleh sesuai dengan metode yang telah dijelaskan sebelumnya [40]. Pada langkah berikutnya, fraksi nonpolar yang diekstraksi, sekitar 30 mg, disaponifikasi (10 menit pada suhu 75 °C) dengan 2 mL larutan KOH/MeOH 0,5 M dan kemudian dilakukan metilasi (10 menit pada suhu 75 °C) menggunakan 2 mL BF<sub>3</sub>/MeOH 14% (v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, AS). Selanjutnya, air ditambahkan ke dalam campuran reaksi dan ester metil asam lemak diekstraksi dengan 10 mL heksana (UQF Wroclaw, Polandia), kemudian dicuci dengan 10 mL natrium bikarbonat 10% (UQF Wroclaw, Polandia) dan dikeringkan dengan natrium sulfat anhidrat. Fase organik diuapkan di bawah tekanan rendah dan disimpan pada -27 °C hingga analisis kromatografi. Profil FAME dievaluasi menggunakan kromatograf gas yang dikombinasikan dengan spektrometer massa (Shimadzu GCMS QP 2020, Shimadzu, Kyoto, Jepang). Pemisahan dilakukan menggunakan kolom kapiler Zebron ZB-FAME dengan panjang 60 m, diameter dalam 0,20 mm, dan ketebalan film 0,20 µm (Phenomenex, Torrance, CA, AS). Analisis GC-MS dilakukan sesuai dengan parameter berikut: mode pemindaian dengan rentang massa dari 40 hingga 400 m/z dalam mode dampak elektronik (EI) pada 70 eV; mode pemindaian 3 scan s<sup>-1</sup>. Analisis dilakukan dengan menggunakan helium sebagai gas pembawa pada laju aliran 1,8 mL menit<sup>-1</sup> dalam rasio split 1:10 dan program berikut: (a) 80 °C selama 2 menit; (b) laju 3,0 °C menit<sup>-1</sup> dari 80 hingga 180 °C; (c) laju 8 °C menit<sup>-1</sup> dari 180 hingga 240 °C. Injector diatur pada suhu 280 °C. Senyawa-senyawa diidentifikasi dengan menggunakan dua metode analitis yang berbeda, yaitu membandingkan waktu retensi dengan bahan kimia otentik (Supelco 37 Component FAME Mix) dan spektrum massa yang diperoleh dengan data pustaka yang tersedia (Willey NIST 17, indeks kecocokan >90%).

### **Aktivitas Penangkap Radikal Bebas DPPH**

Aktivitas penangkap radikal bebas 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ditentukan menggunakan metode yang dijelaskan oleh Yang *et al.* [39]. Untuk tujuan ini, 100 µL ekstrak propolis yang terlarut dalam metanol (10,

20, 50, 100, 150, 200 µg/mL) dimasukkan ke dalam pelat 96 sumur (Nunc, Denmark) dan 100 µL larutan DPPH 0,2 mM (Sigma-Aldrich, Polandia) ditambahkan. Setelah inkubasi selama 15 menit, absorbansi diukur pada panjang gelombang 517 nm menggunakan pembaca pelat multi-sumur (EnSpire Multimode Reader, Perkin Elmer, AS). Asam askorbat (P.P.H. STANLAB Sp.J., Polandia) digunakan sebagai standar. Persentase kapasitas inhibisi dihitung dari persamaan berikut:

$$\text{Persentase Inhibisi} = (A_0 - A_1) / (A_0 \times 100)$$

Persentase inhibisi di mana  $A_0$  adalah absorbansi kelompok kontrol dan  $A_1$  adalah absorbansi ekstrak.

### **Karakterisasi Biologis**

Mengacu pada hasil analisis kimia, ekstrak hexane (HEP) dan ekstrak etanol-hexane (EHEP) dikecualikan dari studi lebih lanjut. Analisis biologis dilakukan hanya untuk ekstrak etanol (EEP) dan ekstrak hexane-ethanol (HEEP), yang ditandai dengan TPC, TFC, dan aktivitas penangkap radikal bebas DPPH tertinggi.

### **Kultur Sel**

Karsinoma sel skuamosa manusia yang berasal dari lidah (garis sel SCC-25, ATCC CRL-1628, ATCC, AS) dikultur dalam campuran 1:1 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) dan medium Ham's F12 (Lonza, Swiss) yang disuplai dengan 10% serum sapi fetus (FBS, Sigma-Aldrich, Polandia) dan antibiotik: penisilin/streptomisin (Sigma-Aldrich, Polandia), seperti yang direkomendasikan oleh ATCC.

Fibroblas gingiva manusia (HGFs) diisolasi secara mekanis dari fragmen jaringan gingiva (1–2 mm) pada pasien sehat, sesuai dengan prosedur yang dijelaskan oleh Dominiak dan Saczko. Biopsi disediakan oleh Departemen Bedah Gigi di Universitas Medis Wroclaw sesuai dengan persyaratan Komisi Bioetika Universitas Medis Wroclaw (Persetujuan Komite Bioetika, No.: KB-8/2010). Fragmen jaringan diambil dengan pisau bedah dan segera ditempatkan di piring Petri (60 mm, Nunc, Denmark) dengan DMEM (Sigma-Aldrich, Polandia) yang mengandung 10% FBS

(Sigma-Aldrich, Polandia) dan antibiotik: penisilin/streptomisin (Sigma-Aldrich, Polandia).

Sel mirin seperti makrofag (garis sel P388-D1, ATCC CCL-46, ATCC, AS) dikultur dalam campuran 1:1 DMEM dan medium RPMI 1640 (Lonza, Swiss) yang disuplai dengan 10% FBS (Sigma-Aldrich, Polandia) dan antibiotik: penisilin/streptomisin (Sigma-Aldrich, Polandia).

Semua garis sel diinkubasi dalam atmosfer lembap pada suhu 37 °C dan 5% CO<sub>2</sub>. Setelah dipepsin dengan 0,25% trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, Polandia), sel-sel tersebut dipindahkan dan dibudidayakan dalam flask 25 cm<sup>2</sup> (Equimed, Polandia). Untuk mengevaluasi sitotoksisitas ekstrak yang diuji, sel-sel disemai ke dalam piring 96-well (Nunc, Denmark). Setelah 24 jam, medium kultur dihilangkan dan kemudian ekstrak propolis yang diencerkan dengan medium kultur yang sesuai (100, 500, dan 1000 µg/mL) ditambahkan selama 5 menit atau 24 jam. Uji MTT dan SRB dilakukan 24 jam kemudian. Semua hasil dibandingkan dengan sel kontrol yang tidak diobati.

### **Uji MTT**

Untuk mengevaluasi sitotoksisitas ekstrak propolis (EEP dan HEEP) berdasarkan perbedaan dalam fungsi mitokondria, uji 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromida (MTT) dilakukan. Sel-sel diinkubasi selama 90 menit dengan 100 µL reagen MTT (Sigma-Aldrich, Polandia) pada suhu 37 °C. Kemudian, kristal formazan dilarutkan dengan penambahan 100 µL isopropanol asam dan diaduk. Absorbansi diukur pada 570 nm menggunakan pembaca piring multiwell (EnSpire Multimode Reader, Perkin Elmer, USA). Hasilnya dinyatakan sebagai persentase sel yang diobati dengan fungsi mitokondria yang berubah dibandingkan dengan sel kontrol yang tidak diobati dengan aktivitas mitokondria normal, yang dianggap sebagai 100%.

### **Uji SRB**

Untuk mengevaluasi sitotoksisitas ekstrak propolis berdasarkan perbedaan dalam kandungan total protein dalam sel, uji sulforhodamin B (SRB)

dilakukan. Protokol ini didasarkan pada prosedur yang dijelaskan dalam. Monolayer sel diperbaiki dengan 10% (vol/vol) asam triklorasetat (Roth, Polandia) selama 1 jam pada suhu 4 °C, kemudian dicuci (lima kali) dengan air dingin dan dikeringkan. Pewarnaan sel dilakukan selama 30 menit menggunakan 0,4% SRB (Sigma-Aldrich, Polandia) dalam 1% asam asetat (Sigma-Aldrich, Polandia) pada suhu ruang. Setelah inkubasi, kelebihan pewarna dihilangkan dengan mencuci menggunakan 1% (v/v) asam asetat (empat kali). Piringan dikeringkan dan pewarna yang terikat protein dilarutkan dalam larutan basa Tris 10 mM (pH 10,5) (BioShop, Kanada). Absorbansi diukur pada 490 nm menggunakan pembaca piring multiwell (GloMax Discover, Promega, USA). Hasilnya dinyatakan sebagai persentase kandungan total protein dalam sel yang diobati dibandingkan dengan sel kontrol yang tidak diobati.

### **Analisis Statistik**

Hasil disajikan sebagai nilai rata-rata  $\pm$  deviasi standar (SD) untuk pengulangan minimum  $n = 9$ . Hasil dianalisis dengan ANOVA satu arah dan  $\alpha = 0,05$  menggunakan perangkat lunak Statistica ver. 13.3 (StatSoft, Polandia). Nilai F dan nilai p ditentukan, nilai  $p \leq 0,05$  dianggap signifikan secara statistik. Uji Tukey HSD dilakukan ketika ANOVA menunjukkan hasil yang signifikan secara statistik. Selain itu, untuk uji MTT dan SRB, signifikansi statistik perbedaan antara nilai rata-rata dari berbagai kelompok dan kelompok kontrol yang tidak diobati dievaluasi dengan uji t Student. Nilai  $p \leq 0,05$  ditandai dengan asterisk dan dianggap signifikan secara statistik. Terakhir, untuk hasil uji MTT dan SRB, uji ANOVA tiga arah dilakukan untuk menunjukkan faktor mana (jenis propolis, jenis ekstrak, konsentrasi ekstrak) yang menentukan perbedaan signifikan antara kelompok, di mana  $p \leq 0,05$  dianggap signifikan secara statistik.

### **Kesimpulan**

Studi ini telah mengungkapkan perbedaan dalam komposisi kimia dan aktivitas antioksidan dari ekstrak tiga jenis propolis Polandia yang diperoleh setelah ekstraksi dengan etanol, heksana, dan kombinasi keduanya. Produk yang dipilih (EEP dan HEEP) menunjukkan aktivitas antikanker pada sel

kanker lidah dan sitotoksitas terhadap makrofag murin. Selain itu, EEP dan HEEP tidak memiliki efek sitotoksik pada fibroblas gingiva normal ketika konsentrasi terendah diterapkan. Kesimpulan berikut dapat diambil berdasarkan hasil yang diperoleh:

1. Hasil ekstraksi total tertinggi diperoleh untuk ekstrak etanol dan ekstrak heksana-etanol (EEP dan HEEP).
2. Kandungan total polifenol (TPC) dan kandungan total flavonoid (TFC) dari ekstrak etanol dan ekstrak heksana-etanol (EEP dan HEEP) jauh lebih tinggi dibandingkan TPC dan TFC dari ekstrak etanol-heksana dan ekstrak heksana (EHEP dan HEP).
3. Potensi antioksidan dari ekstrak etanol dan ekstrak heksana-etanol (EEP dan HEEP) jauh lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak etanol-heksana dan heksana (EHEP dan HEP).
4. Ekstrak yang dipilih (EEP dan HEEP) menunjukkan aktivitas antikanker pada sel kanker lidah; inkubasi selama 24 jam secara signifikan mempengaruhi viabilitas sel dan proliferasi sel.
5. Ekstrak propolis yang diuji pada konsentrasi lebih tinggi (500 dan 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) juga mengganggu proliferasi sel normal.
6. Sitotoksitas yang diamati dari ekstrak yang dipersiapkan terhadap makrofag murin memerlukan penyelidikan lebih lanjut untuk mengevaluasi potensi anti-inflamasi mereka.

Sebagai kesimpulan akhir, kami dapat memilih dosis minimal 100  $\mu\text{g/mL}$  dari ekstrak yang diterapkan, yang menyebabkan efek antikanker pada sel kanker lidah manusia dengan efek sitotoksik yang terbatas pada sel mukosa normal dan potensi anti-inflamasi simultan. Namun, penelitian lebih lanjut tentang propolis Polandia masih diperlukan untuk menjelaskan secara menyeluruh mekanisme molekuler dari aksinya dan untuk memperoleh manfaat kesehatan yang menjanjikan dari produk alami yang serbaguna ini.



## Bab 8

### Aktivitas Antimikroba dan Antioksidan pada Tanaman Herbal

#### A. Aktivitas Antimikroba Tanaman Paku (*Stenochlaena palustris* dan *Pteridium caudatum*) Terhadap Bakteri

Kalimantan merupakan pulau terbesar di Indonesia yang beriklim tropis dengan sumber kekayaan hayati yang sangat melimpah. Keanekaragaman hayati tersebut berpotensi untuk dijadikan sebagai tumbuhan obat, insektisida alami, produksi makanan dan minyak serta produksi barang-barang kerajinan tangan. Salah satu tumbuhan yang tumbuh subur di daerah Tarakan adalah tumbuhan paku, karena tumbuhan paku mudah tumbuh subur di daerah dengan lingkungan yang lembab dan beriklim tropis. Hal ini memungkinkan tumbuhan paku tumbuh liar sehingga keberadaanya dianggap sebagai gulma bagi pertanian seperti tumbuhan paku *P. caudatum*. Disisi lain, sebagian tanaman paku merupakan tanaman hortikultura yang bermanfaat sebagai sayuran, tanaman hias, kerajinan tangan dan obat tradisional. Padahal fungsi utama tanaman hortikultura yang dikenal adalah sebagai penyediaan pangan, ekonomi, kesehatan, dan sosial budaya.

Kalimantan merupakan pulau terbesar di Indonesia yang beriklim tropis dengan sumber kekayaan hayati yang sangat melimpah. Keanekaragaman hayati tersebut berpotensi untuk dijadikan sebagai tumbuhan obat, insektisida alami, produksi makanan dan minyak serta produksi barang-barang kerajinan tangan. Salah satu tumbuhan yang tumbuh subur di daerah Tarakan adalah tumbuhan paku, karena tumbuhan paku mudah tumbuh subur di daerah dengan lingkungan yang lembab dan beriklim tropis. Hal ini memungkinkan tumbuhan paku tumbuh liar sehingga keberadaannya dianggap sebagai gulma bagi pertanian seperti tumbuhan paku *P. caudatum*. Disisi lain, sebagian tanaman paku merupakan tanaman hortikultura yang bermanfaat sebagai sayuran, tanaman hias, kerajinan tangan dan obat tradisional. Padahal fungsi utama tanaman hortikultura yang dikenal adalah sebagai penyediaan pangan, ekonomi, kesehatan, dan sosial budaya.

Tumbuhan paku yang memiliki aktivitas antioksidan dan antibakteri karena adanya senyawa metabolit sekunder yang ada pada tumbuhan tersebut, yaitu alkaloid, flavonoid, saponin dan steroid. Ibrahim *et al.* melaporkan bahwa senyawa triterpenoid, flavonoid, steroid dan Shikimic acids terdapat pada tumbuhan paku *Adiantum capillus*. Sedangkan pada tumbuhan kelakai (*Stenochlaena palustris*) juga mengandung alkaloid, steroid, dan flavonoid yang dapat dijadikan sebagai antibakteri. Kemampuan sebagai antibakteri ditunjukkan oleh ekstrak metanol paku sayur (*Diplazium esculentum*) dengan konsentrasi 100% membentuk diameter daerah hambat pada pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* sebesar 13,33 mm dan *Escherichia coli* sebesar 9.20 mm secara *in vitro*. Selain itu, ekstrak etanol daun (*Stenochlaena palustris*) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Salmonella thypi* dan *Staphylococcus aureus* dengan diameter daerah hambat secara berturut-turut 15.20 mm dan 18.53 mm pada konsentrasi 12.5%.

Tumbuhan paku *Stenochlaena palustris* dan *Pteridium caudatum* diduga memiliki potensi yang sama sebagai antibacterial agent. Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Ralstonia*

*Solanacearum* dan *Streptococcus sobrinus*. *R. solanacearum* merupakan penyebab penyakit layu bakteri yang menginfeksi berbagai jenis tanaman terutama famili *Solanaceae*, seperti penyakit layu bakteri pada tanaman cabai, tanaman tomat, kentang, dan tembakau. Infeksi bakteri tersebut dapat mengakibatkan kegagalan panen pada tanaman tomat sampai 100%, cara mengendalikan penyakit tanaman tersebut petani sangat tergantung dengan pestisida kimia. Penggunaan pestisida kimia secara berlebihan akan menyebabkan dampak negatif pada lingkungan, oleh karena itu untuk mengurangi efek negatif dari senyawa pestisida kimia perlu dikembangkan penggunaan pestisida nabati. Senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tumbuhan selain dimanfaatkan sebagai obat tradisional juga dapat dimanfaatkan sebagai bahan aktif pestisida nabati.

Pestisida nabati merupakan pestisida yang aman terhadap lingkungan dan menghasilkan produk pertanian yang sehat karena senyawa kimia yang ada pada pestisida nabati berasal dari tumbuhan. Sebuah penelitian menunjukkan adanya potensi pestisida nabati pada tumbuhan patikan kebo (*Euphorbia hirta* L.) pada konsentrasi 100% yang mampu menghambat pertumbuhan *R. solanacearum*, *E. coli* dan *S. aureus* dengan diameter daerah hambat berturut-turut sebesar 18.26 mm, 17.06 mm dan 21.8 mm secara *in vitro*. Senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tumbuhan paku selain diduga memiliki potensi untuk dijadikan sebagai pestisida nabati juga berkhasiat sebagai obat untuk kesehatan gigi dan mulut manusia.

Oleh karena itu, tumbuhan paku *S. palustris* dan *P. caudatum* diduga memiliki potensi untuk menghambat *S. sobrinus* yang merupakan salah satu mikroorganisme yang banyak ditemukan di rongga mulut dan merupakan bakteri penyebab awal proses karies gigi. *S. sobrinus* merupakan bakteri penyebab karies gigi karena mampu menghasilkan asam (asidogenik) dan asam laktat, selain itu bakteri ini juga mampu hidup pada lingkungan asam dan anaerobik serta memiliki kemampuan untuk melekat pada permukaan gigi. Kegunaan dan khasiat yang diperoleh dari berbagai jenis tumbuhan paku sangat banyak terutama di dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai

obat tradisional untuk menyembuhkan berbagai macam penyakit, karena tumbuhan ini mudah didapatkan oleh masyarakat dan tidak memiliki efek samping yang membahayakan kesehatan. Namun sejauh ini masih sedikit penelitian yang mengungkapkan aktivitas antibakteri dari ekstrak daun paku *S. palustris* dan *P. caudatum*, sehingga perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui potensi dari ekstrak daun *S. palustris* dan *P. caudatum* yang dapat menghambat pertumbuhan *R. solanacearum* dan *S. sobrinus*.

## Metode

### 1. Alat dan Bahan

Bahan baku diambil di lahan Hutan Pendidikan Universitas Borneo Tarakan. Bahan lain yang digunakan adalah aquades, etanol, mikroba *S. sobrinus* dan *R. solanacearum*, nutrient agar (Difco), chloramphenicol, glukosa (Merck). Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu spektrofotometer model Shimadzu UV Vis 1200 (Shimadzu co, Jepang), evaporator (Eyela, Tokyo), shaker, oven, autoclave model All Americans.

### 2. Persiapan Sampel

Sampel tanaman paku (*S. palustris* dan *P. caudatum*) dikumpulkan yang terdiri dari seluruh bagian daun. Selanjutnya sampel dipotong-potong agar terbagi menjadi bagian yang lebih kecil 0.5 cm agar mudah dalam proses pengeringan. Pengeringan sampel dilakukan di oven pada suhu 39<sup>o</sup> C selama 3 x 24 jam. Sampel yang telah kering kemudian dihaluskan dengan blender untuk menghasilkan serbuk kasar. Perendaman dilakukan dengan etanol.

### 3. Pengujian Aktivitas Antimikroba

Bahan utama yang digunakan untuk pembuatan media pertumbuhan bakteri adalah nutrient agar (DIFCO). Media pertumbuhan bakteri dibuat dengan cara mencampur 20 g nutrient agar, glukosa 10 g, dan aquades 1000 ml dan dididihkan sampai melarut sempurna, dimasukkan ke dalam botol untuk disterilisasi dengan autoclave pada suhu 121<sup>o</sup> C selama 15 menit. Pengujian antimikroba dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar sumuran. Dalam pengujian

ini sebanyak 20 ml media NA dituangkan ke dalam Petridish yang sudah disterilkan selama 15 menit dengan temperatur 121o C dalam autoclave. Setelah itu pada keadaan aseptik (dalam laminar flow) biarkan media mengeras, kemudian dilabur dengan suspensi bakteri dengan densitas setara dengan 10<sup>6</sup> cells/ml (standar 0.5 McFarland) sebanyak 100 µl kemudian diratakan dengan menggunakan kaca perata dan biarkan mengering selama ± 60 menit. Selanjutnya ekstrak sampel diuji dalam beberapa konsentrasi (0.5%, 1% dan 2%) untuk mengetahui efektivitas peningkatan konsentrasi pada aktivitas penghambatan terhadap mikroba uji minimum. Kontrol positif yang digunakan adalah Chloramphenicol dengan dosis 10 µg dan kontrol negatif yang digunakan adalah aseton. Aktifitas antimikrobial ditandai dengan adanya zona hambat disekitar sumuran yang mengandung ekstrak, dengan angka lebih besar dari 8 mm dan dilakukan sebanyak 3 kali ulangan.

## **Hasil Dan Pembahasan**

### **Hasil**

Pada penelitian ini telah dilakukan pengamatan mengenai uji aktivitas antibakteri ekstrak daun tumbuhan paku (Pteridophyta) terhadap *R. solanacearum* dan *S. sobrinus* secara *in vitro*. Parameter yang diamati yaitu faktor kelembaban (FK), persentase rendemen, dan persentase penghambatan. Perhitungan faktor kelembaban (FK) dilakukan setelah memperoleh nilai berat kering tanur dari sampel yang digunakan. Perhitungan ini bertujuan untuk mengetahui besarnya kandungan air di dalam bahan. Sampel daun segar *S. palustris* dan *P. caudatum* yang masing-masing berat awal 1 g, diperoleh factor kelembaban daun *S. palustris* yaitu 0.37 dan *P. caudatum* yaitu 0.37.

### **Persentase Rendemen**

Proses ekstraksi daun *S. palustris* dan *P. caudatum* dilakukan menggunakan metode maserasi. Hasil perhitungan persentase rendemen dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Hasil rendemen ekstrak

Sampel	Bobot awal (g)	Bobot ekstrak (g)	Rendemen (%)
<i>S. palustris</i>	32.97	0.51	1.6
<i>P. caudatum</i>	56.49	1.41	2.5

Hasil rendemen menunjukkan bahwa jumlah ekstrak etanol *P. caudatum* lebih besar (2.5%) dibandingkan dengan daun *S. palustris* (1.6%). Hal ini diduga semakin tinggi nilai rendemen yang dihasilkan menandakan jumlah ekstrak yang dihasilkan semakin banyak. Selain itu juga dipengaruhi oleh jenis pelarut yang digunakan, semakin polar pelarut yang digunakan maka akan semakin banyak senyawa yang akan terekstrak.

### **Persentase Penghambatan**

Pengamatan aktifitas antimikroba dilakukan dengan cara mengukur diameter daerah hambat di sekitar sumuran yang mengandung ekstrak dengan menggunakan mistar. Perhitungan persentase penghambatan ditentukan berdasarkan daya hambat relatif terhadap kontrol positif. Hasil perhitungan persentase penghambatan dapat dilihat pada Tabel 2. Persentase penghambatan menunjukkan bahwa ekstrak daun *S. palustris* dan *P. caudatum* tidak memiliki daya hambat terhadap *R. solanacearum*. Tetapi kontrol positif pada *R. solanacearum* menghambat 100% (rata-rata DDH 45 mm). Sedangkan pada *S. sobrinus* menunjukkan bahwa ekstrak daun *S. palustris* dan *P. caudatum* memiliki aktivitas antibakteri. Ekstrak daun *S. palustris* mampu menghambat *S. sobrinus* pada konsentrasi 0.5%, 1% dan 2% dengan nilai persentase hambat secara berturut-turut 18.8%, 20.9% dan 26.5% dengan kontrol positif 100% (rata-rata DDH 39.2 mm). Sedangkan ekstrak *P. caudatum* pada konsentrasi 0.5%, 1% dan 2% dengan nilai persentase hambat secara berturut-turut 22.9%, 29.7% dan 37.7% dengan kontrol positif 100% (rata-rata DDH 36.3 mm).

**Tabel 2.** Hasil perhitungan persentase penghambatan

Nama Tumbuhan	Bagian	Persentase Penghambatan (%)					
		Bakteri <i>R. solanacearum</i>			Bakteri <i>S. sobrinus</i>		
		2%	1%	0,5%	2%	1%	0,5%
<i>S. palustris</i>	Daun	0%	0%	0%	26.5	20.9	18.8
<i>P. caudatum</i>	Daun	0%	0%	0%	37.7	29.7	22.9

## Pembahasan

### Perhitungan Faktor Kelembaban

Faktor kelembaban daun *S. palustris* dan *P. caudatum* menunjukkan nilai yang sama yaitu 0.37. Faktor kelembaban dalam suatu bahan sangat diperlukan dalam suatu ekstrak tanaman karena penetapan aktivitas air memberikan batasan minimal besarnya kandungan air dalam bahan. Menurut Isnawati, Arifin (2006) kadar air yang disyaratkan untuk proses ekstraksi tidak boleh melebihi 10% karena dapat memicu pertumbuhan mikroorganisme. Menurut Susiani *et al.* (2017) simplisia yang ditumbuhi kapang dan jamur akan berpengaruh pada zat aktif yang terkandung di dalamnya. Oleh karena itu proses pengeringan dilakukan sampai daun dengan kadar air rendah yang diindikasikan mudah diremukkan. Menurut Cahyono (2011) bahan yang mudah meremah atau mudah patah setelah pengeringan memiliki kadar air rendah.

Daun dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di udara terbuka pada suhu kamar yang terlindung dari sinar cahaya matahari. Hal ini dilakukan untuk menghindari kerusakan kandungan senyawa yang ada dalam suatu simplisia yang mempunyai aktivitas antioksidan dan antibakteri. Hasil penelitian Luliana *et al.* (2016) pengeringan simplisia daun (*Melastoma malabathricum* L.) dengan cara pengeringan angin pada suhu kamar memiliki antioksidan tertinggi yaitu 54.60% dibandingkan dengan cara pengeringan oven pada suhu 40°C (52.76%), pengeringan sinar matahari langsung (38.06%), pengeringan sinar matahari tidak langsung (49.19%) dan sampel segar (35.79%). Hal ini dikarenakan senyawa antioksidan dan flavonoid bersifat sensitif terhadap cahaya dan panas.

### **Persentase Rendemen**

Perhitungan persentase rendemen bertujuan untuk mengetahui berapa jumlah simplisia yang diperlukan untuk ekstraksi agar diperoleh sejumlah ekstrak yang diinginkan. Berdasarkan hasil perhitungan yang memiliki nilai persentase rendemen yang tertinggi terdapat pada ekstrak etanol daun *P. caudatum* yaitu 2,5% sedangkan daun *S. palustris* yaitu 1,6%. Hal ini diduga karena bobot simplisia yang digunakan pada daun *P. caudatum* lebih besar (56.49 g) sedangkan daun *S. palustris* (32.97 g). Menurut Irsyad (2013) hasil rendemen dapat dijadikan acuan untuk mengetahui jumlah simplisia yang dibutuhkan untuk pembuatan sejumlah tertentu ekstrak kental. Selain itu, penentuan rendemen juga berfungsi untuk mengetahui kadar metabolit sekunder yang terekstrak oleh pelarut yang digunakan.

Menurut Febrina *et al.* (2015) metode ekstraksi yang digunakan merupakan salah satu faktor yang akan mempengaruhi rendemen suatu ekstrak. Ekstraksi menggunakan pelarut terdiri dari cara dingin, meliputi maserasi, perkolasi dan cara panas meliputi refluks, soxhletasi, infus, dekoh, dan digesti. Sampel *S. palustris* dan *P. caudatum* diekstraksi dengan metode maserasi. Maserasi dilakukan dengan merendam simplisia menggunakan pelarut dengan pengadukan pada suhu ruang. Metode maserasi dipilih sebagai proses ekstraksi karena metode ini merupakan metode ekstraksi cara dingin, sehingga dapat mencegah terurainya metabolit yang tidak tahan dengan pemanasan. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pelarut tunggal yaitu etanol. Menurut Dia *et al.* (2015) pelarut etanol memiliki polaritas yang tinggi yaitu 4,3 sehingga dapat mengekstrak senyawa yang bersifat polar, diantaranya senyawa fenolik, steroid, terpenoid, alkaloid dan glikosida. Selain itu, etanol dapat bercampur dengan air pada segala perbandingan, absorbsinya baik, netral, dan tidak beracun (Anggraeni, Erwin 2015).

### **Persentase Penghambatan**

Metode yang digunakan pada pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun *S. palustris* dan *P. caudatum* adalah metode difusi agar (sumuran), seperti yang telah dilakukan (Kuspradini 2012). Aktivitas penghambatan

ekstrak *S. palustris* dan *P. caudatum* dilihat dengan terbentuknya zona hambat (zona bening) disekitar sumuran setelah diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Perhitungan persentase penghambatan yang digunakan sebagai kontrol positif yaitu Chloramphenicol, karena berspektrum luas yang efektif untuk menghambat bakteri Gram positif dan Gram negatif. Menurut Olson (2004) mekanisme dari Chloramphenicol yaitu menghambat sintesis protein, mencegah ujung aminoasil t-RNA bergabung dengan peptidil transferase. Sedangkan kontrol negatif yang digunakan yaitu etanol 40% untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh pelarut terhadap pertumbuhan *R. solanacearum* dan *S. sobrinus*. Sehingga dapat diketahui bahwa yang mempunyai aktivitas antibakteri adalah zat uji bukan pelarut. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak daun *S. palustris* dan *P. caudatum* terhadap *R. solanacearum* diamati setelah inkubasi 18- 24 jam.

Ekstrak *S. palustris* dan *P. caudatum* tidak dapat menghambat pertumbuhan *R. solanacearum*. Hal ini diduga karena senyawa aktif pada ekstrak daun *S. palustris* dan *P. caudatum* sebagai antibakteri jumlahnya sedikit. Heriyati *et al.* (2016) melaporkan semakin tinggi senyawa metabolit sekunder maka kemampuan penghambatan meningkat terhadap pertumbuhan bakteri. Anggelika *et al.* (2014) menunjukkan ekstrak tumbuhan petikan (*Euphorbia hirta* L.) dengan konsentrasi 100% mampu menghambat pertumbuhan bakteri *R. solanacearum* sebesar 18.26 mm. Menurut Firmansyah (2015) senyawa bioaktif dikatakan mempunyai aktivitas yang tinggi terhadap mikroba apabila mempunyai nilai konsentrasi penghambatan mikroba yang terendah, tetapi mempunyai diameter penghambatan yang besar.

Adapun hasilnya menunjukkan hasil positif dengan terbentuknya zona hambat disekitar sumuran pada *S. sobrinus* yang berisi ekstrak *S. palustris* dan *P. caudatum*. Hal ini disebabkan oleh keberadaan metabolit sekunder sehingga memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan bakteri uji. Kandungan metabolit sekunder yang terdapat pada tumbuhan paku secara umum adalah alkaloid, flavonoid, saponin, dan steroid (Khoiri 2009). Menurut Shirotake (2014) mekanisme zat antimikroba

bekerja secara ekstraseluler dan intraseluler. Ekstraseluler dengan cara menghambat sintesis dinding sel, menurunkan permeabilitas membran sel dan menurunkan fungsi asam nukleat. Intraseluler dengan cara menghambat sintesis protein dan sintesis asam folat. Aktivitas antibakteri terdiri dari 2 jenis yaitu aktivitas bakteriostatik yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri dengan menginfeksi komponen yang dibutuhkan untuk berkembang biak, seperti mensintesis protein, mengganggu sintesis DNA dan menurunkan permeabilitas membran sel. Sedangkan aktivitas bakterisidal yaitu menghambat pembentukan dinding sel dan bersifat toksik pada sel bakteri (Pratiwi 2017).

Menurut Nurjanah *et al.* (2018) uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi dan metode pengenceran. Metode difusi yaitu mengukur diameter zona bening oleh suatu senyawa dalam ekstrak. Metode difusi dilakukan dengan metode agar sumuran. Sedangkan metode pengenceran yaitu senyawa antibakteri diencerkan dari berbagai macam konsentrasi kemudian masing-masing konsentrasi ditambahkan suspensi bakteri uji dalam media cair. Setelah itu diinkubasi selama 18-24 jam. Oleh karena itu, hasil uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) menunjukkan bahwa konsentrasi 11% menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans* dan pada konsentrasi 16% menghambat pertumbuhan bakteri *S. sanguinis*. Kemudian konsentrasi yang menghambat bakteri tersebut dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan bakteri uji dan senyawa antibakteri. Hal ini dilakukan untuk mengetahui Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Hasil uji KBM menunjukkan bahwa daun kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) pada bakteri *S. mutans* bersifat bakterisidal pada konsentrasi 11% karena media cair terlihat jernih setelah inkubasi, sedangkan *S. sanguinis* bersifat bakteriostatik karena pada konsentrasi 16% masih terdapat pertumbuhan bakteri pada cawan petridish.

Rikomah *et al.* (2017) aktivitas bakteriostatik ditunjukkan dengan adanya bintik putih di daerah zona bening yang diduga sebagai koloni bakteri. Oleh karena itu, dalam penelitian ini ekstrak etanol daun tumbuhan *S. palustris* dan *P. caudatum* bersifat bakterisidal karena tidak ada bintik

putih di daerah zona bening. Daun tumbuhan *S. palustris* dan *P. caudatum* memiliki aktivitas antibakteri karena adanya senyawa flavonoid yang membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (Heriyati *et al.* 2016). Saponin yang terkandung dapat menurunkan tegangan permukaan sehingga mengakibatkan naiknya permeabilitas atau kebocoran sel dan mengakibatkan senyawa intraseluler akan keluar (Nuria *et al.* 2009). Kusumawati (2015) melaporkan saponin bekerja sebagai antimikroba dengan mengganggu stabilitas membran sel bakteri sehingga menyebabkan sel bakterilisis. Hal ini menyebabkan sitoplasma bocor sehingga senyawa intraseluler keluar dari sel yang mengakibatkan kematian sel.

Husna *et al.* (2015) senyawa alkaloid memiliki kemampuan sebagai antibakteri dengan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk utuh kemudian menyebabkan kematian sel. Lamothe *et al.* (2009) melaporkan mekanisme kerja alkaloid yaitu melalui penghambatan sintesis dinding sel yang akan menyebabkan lisis pada sel sehingga sel akan mati. Mekanisme steroid sebagai antibakteri berhubungan dengan membran lipid dan sensitivitas terhadap komponen steroid yang menyebabkan kebocoran (Madduluri *et al.* 2013).

Berdasarkan dengan nilai persentase penghambatan pada konsentrasi 2% menunjukkan ekstrak etanol daun *S. palustris* (26.5%) dan *P. caudatum* (37.7%) lebih besar dibandingkan dengan konsentrasi 0.5% dan 1%. Hal ini menunjukkan semakin tinggi konsentrasi akan semakin besar diameter daerah hambat pada sumuran. Menurut Ajizah (2004) peningkatan konsentrasi suatu ekstrak akan meningkatkan kadar senyawa metabolit sekunder dalam penghambatan pertumbuhan bakteri. Selain itu, besar kecilnya diameter daerah hambat yang terbentuk dapat pula dipengaruhi oleh mutu ekstrak daun. Faktor yang mempengaruhi mutu ekstrak daun yaitu faktor biologi dan faktor kimia. Faktor biologi meliputi spesies tanaman, lokasi tanaman asal, waktu pemanenan, penyimpanan bahan

baku, umur serta bagian tanaman yang digunakan. Sedangkan faktor kimia terdiri dari faktor internal seperti senyawa aktif dalam bahan, komposisi kualitatif senyawa aktif, dan kadar total rata-rata senyawa aktif. Faktor eksternal seperti metode ekstraksi, jenis pelarut yang digunakan, kandungan logam berat, ukuran kekerasan dan kekeringan bahan (Maradona 2013).

Berdasarkan hasil analisis diameter daerah hambat *R. solanacearum* menunjukkan pengaruh yang tidak nyata terhadap semua perlakuan rerata diameter daerah hambat. Sedangkan pada *S. sobrinus* menunjukkan pengaruh yang sangat nyata terhadap semua perlakuan rerata diameter daerah hambat. Hal ini diduga karena bakteri Gram negatif dan Gram positif mempunyai dinding sel yang berbeda susunan kimianya. Perbedaan lapisan dinding sel bakteri Gram positif dan Gram negatif.

*R. solanacearum* merupakan bakteri Gram negatif yang memiliki struktur dinding sel yang lebih kompleks sehingga senyawa terkandung pada ekstrak tidak dapat merusak dinding sel pada *R. solanacearum*. Kandou dan Pandiangana (2018) bakteri Gram negatif mempunyai lapisan dinding sel yaitu lipoprotein, lipopolisakarida, dan peptidoglikan. Husna *et al.* (2015) menyatakan bakteri Gram negatif memiliki sistem seleksi terhadap zat-zat asing yaitu pada lapisan lipopolisakarida dan lapisan selaput luar yang terletak diluar lapisan peptidoglikan pada bakteri Gram negatif berfungsi mencegah kebocoran dari protein periplasma dan melindungi sel.

Wahyuni *et al.* (2016) porin yang terkandung pada membran terluar bakteri Gram negatif menyebabkan molekul-molekul komponen ekstrak sulit masuk ke dalam sel bakteri. Hal ini disebabkan karena perbedaan sifat antara porin dan ekstrak. Porin bersifat hidrofilik sedangkan ekstrak bersifat hidrofobik. Akibatnya dalam kondisi demikian bakteri dapat bertahan hidup, memperbanyak diri dan mampu menekan produksi metabolit sitotoksik sel fagosit yang menyebabkan terjadinya deaktivasi makrofag melawan infeksi bakteri tersebut. Sedangkan *S. sobrinus* merupakan bakteri Gram positif yang memiliki struktur dinding sel

yang lebih sederhana, sehingga senyawa yang terdapat pada ekstrak lebih mudah merusak dinding sel bakteri. Husna *et al.* (2015) melaporkan dinding sel bakteri Gram positif hanya tersusun dari satu lapisan yaitu lapisan peptidoglikan yang relatif tebal.

### **Kesimpulan**

Ekstrak etanol daun *S. palustris* dan daun *P. caudatum* memiliki kemampuan untuk menghambat bakteri *S. sobrinus* pada konsentrasi 2% dengan diameter 13.7 mm, namun tidak mampu menghambat pertumbuhan *R. Solanacearum*.

### **B. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Akar Kelakai**

---

Penggunaan tumbuh-tumbuhan alami sebagai tanaman obat di Indonesia sedang populer, kebanyakan masyarakat di daerah-daerah mempercayai bahwa penggunaan tumbuhan alami sebagai obat relatif aman karena tidak memiliki efek samping yang berlebih (Sharma *et al.*, 2014). Kalimantan sebagai daerah hujan tropis menyimpan sekurangnya 4.000 spesies tumbuhan yang dapat menjadi sumber temuan obat baru (Kepmenkes, 2007). Tanaman khas Kalimantan yang banyak digunakan sebagai tanaman obat adalah kalakai atau sering juga disebut paku haruan (*Stenochlaena palustris* Bedd) atau pakis. Kalakai di Filipina disebut sebagai barangbang, dan di Malaysia disebut sebagai pucuk manis.

Penelitian sebelumnya telah menjelaskan bahwa kalakai atau pakis (daun dan batang) mengandung zat besi yang sangat tinggi sehingga baik digunakan pada penderita anemia (Maharani *et al.*, 2013). Liu *et al.* (1999) menyebutkan bahwa terdapat 5 (lima) glikosida flavonol baru dalam daun *Stenochlaena palustris*, dimana satu sampai empat dari kandungan tersebut secara signifikan menunjukkan aktivitas antibakteri gram negatif. Selain itu, kalakai atau pakis juga mengandung beberapa senyawa bioaktif seperti fenolik, flavonoid, alkaloid dan keluarga terpenoid (Ho *et al.*, 2010) yang telah terbukti sangat efektif sebagai antioksidan (Dai & Mumper, 2010). Senyawa fenolik seperti antosianin dan beberapa zat besi paling banyak terdapat pada daun muda dari pakis (Chai *et al.*, 2012).

Akar kalakai (*Stenochlaena palustris*) belum banyak diteliti. Data ilmiah yang mendukung efektivitas akar kalakai sebagai antioksidan belum banyak dilakukan sehingga minim informasi pada publikasi ilmiah yang hal tersebut pada bagian akar kalakai. Kalakai merupakan tumbuhan yang tumbuh subur di tanah gambut dan juga ditemukan tumbuh baik di tanah berpasir. Secara karakteristik sifat fisik dan sifat kimianya, terdapat perbedaan yang signifikan antara tanah gambut dan tanah berpasir. Tanah gambut merupakan tanah dengan kandungan organik  $\geq 50\%$  (Mankinen dan Gelfer, 1982) bahkan  $\geq 75\%$  (ASTM, 1985). Penelitian ini bertujuan mengetahui aktivitas antioksidan dari akar kalakai (*Stenochlaena palustris*) yang tumbuh pada tanah gambut dan tanah berpasir berdasarkan parameter Inhibitory Concentration 50 ( $IC_{50}$ ) dengan metode 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

### **Metode Penelitian**

#### **Bahan**

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini adalah akar kalakai. Bahan baku tumbuhan ini diambil dari dua lokasi dengan jenis tanah yang berbeda yaitu tanah gambut terletak di Jl. Dolin Kandang (Mahir Mahar) Palangkaraya dan tanah berpasir di Jl. Cilik Riwut KM 22 Palangkaraya.

#### **Pengumpulan dan Pengolahan Simplisia**

Proses penyiapan simplisia dilakukan dengan melakukan sortasi basah, pencucian dengan air bersih, penirisan, perajangan. Proses pengeringan dilakukan dengan mengeringkan di tempat yang teduh (kering-angin). Kemudian dilakukan sortasi kering, selanjutnya simplisia kering tersebut dibuat dalam bentuk serbuk. Serbuk diayak dengan pengayak nomor 14.

#### **Pembuatan Ekstrak**

Serbuk ditimbang sebanyak 100 gram kemudian diekstraksi menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:10 selama 3x24 dengan pergantian pelarut setiap 24 jam. Ekstrak cair kemudian dipisahkan dari residu menggunakan kertas saring. Dilakukan remaserasi sebanyak 2 kali. Ekstrak cair yang diperoleh dipisahkan menggunakan rotary evaporator,

kemudian diuapkan di atas waterbath hingga terbentuk ekstrak kental (Jamshidi *et al.*, 2014).

Pembuatan larutan kuersetin sebagai pembanding

Larutan kuersetin dibuat seri kadar dengan konsentrasi berbeda yaitu 1; 2; 3; 4; 5; dan 6 ppm. Larutan sebanyak 0,5 mL DPPH 0,4 mM ditambahkan dengan masing-masing larutan standar kuersetin sebanyak 2 ml, kemudian didiamkan di tempat gelap selama operating time. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang maksimum.

Pengujian aktivitas antioksidan

Larutan sampel dibuat dengan variasi konsentrasi 10, 20, 40, 60, 80 ppm. Sebanyak 0,5 ml larutan DPPH 0,4 mM ditambahkan pada setiap larutan sampel sebanyak 2 mL kemudian larutan didiamkan ditempat gelap selama operating time dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum.

Analisis Data

Nilai  $IC_{50}$  merupakan konsentrasi sampel yang dapat menghambat radikal 74 Volume 05, Nomor 01 (2018) Jurnal Pharmascience bebas sebesar 50% diperoleh dengan memakai persamaan regresi linear  $y = bx + a$ . Data hasil absorbansi masing-masing sampel digunakan untuk mencari % inhibisinya.

**Tabel 1.** Aktivitas Antioksidan Berdasarkan Nilai  $IC_{50}$   
(Jun *et al.*, 2003).

Aktivitas	Nilai $IC_{50}$
Sangat Aktif	<50 ppm
Kuat	50-100 ppm
Sedang	101-250 ppm
Lemah	250-500 ppm
Tidak Kuat	>500 ppm

## Hasil dan Pembahasan

Uji aktivitas antioksidan memakai metode peredaman radikal bebas 2,2- difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) dengan menggunakan alat spektrofotometer UVVis. Metode ini memiliki kelebihan karena sederhana, mudah, cepat dan memerlukan sedikit sampel (Hanani *et al.*, 2005).

Senyawa DPPH merupakan senyawa radikal bebas yang stabil yang dapat dijadikan model dalam penentuan aktivitas antioksidan suatu sampel. Antioksidan dapat memberikan elektronnya kepada DPPH, sehingga terjadi perubahan warna dari ungu kehitaman menjadi warna kuning (Vaya & Aviram, 2001). DPPH dapat larut dalam pelarut organik yang memiliki sifat polar diantaranya pelarut metanol dan etanol (Rohman & Riyanto, 2005).

Uji aktivitas antioksidan dibandingkan dengan suatu kontrol positif untuk membandingkan antioksidan yang dimiliki. Kuersetin digunakan sebagai kontrol positif karena terbukti memiliki aktivitas antioksidan. Kuersetin mengandung gugus OH pada posisi 3', 4', 3, 5, dan 7 (Salamah & Widyasari, 2015). Gugus OH mampu menstabilkan radikal bebas melalui mekanisme transfer atom H atau transfer elektron dari gugus tersebut.

Persamaan regresi yang didapat dari hubungan konsentrasi kuersetin dengan persen inhibisi yaitu  $y = 7,633x - 30,256$  dengan koefisien korelasi ( $r$ ) sebesar 0,995. Besarnya nilai  $IC_{50}$  kuersetin yaitu pada konsentrasi 2,6 ppm. Hasil nilai  $IC_{50}$  tersebut menunjukkan kuersetin masuk dalam kategori antioksidan yang sangat aktif (Jun *et al.*, 2003). Semakin kecil nilai  $IC_{50}$ , maka semakin besar aktivitas antioksidan. Hal tersebut disebabkan semakin kecil konsentrasi yang diperlukan sampel dalam menghambat radikal bebas. Hasil ini juga dapat menunjukkan validitas metode dalam pengujian antioksidan karena secara teoritis kuersetin memiliki aktivitas yang kuat dalam melawan radikal bebas.

Aktivitas antioksidan diuji pada sampel menggunakan metode DPPH. Sampel dibuat dalam bentuk seri konsentrasi, selanjutnya ditambahkan DPPH, dilakukan inkubasi selama 30 menit untuk memastikan reaksi terjadi sempurna. Campuran larutan tersebut kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 516 nm. Absorbansi sampel dapat dihitung untuk mendapatkan persen inhibisi.

**Tabel 2.** Hasil  $IC_{50}$  Ekstrak Etanol Akar Kalakai Pada Tanah Gambut dan Pasir

No.	Sampel	$IC_{50}$
1.	Ekstrak etanol akar kalakai pada tanah gambut	19,06 ppm
2.	Ekstrak etanol akar kalakai pada tanah pasir	24,40 ppm

Hasil perhitungan  $IC_{50}$  untuk ekstrak akar kalakai pada tanah gambut dari persamaan linier  $y = 0,599x + 38,577$  yaitu sebesar 19,06 ppm. Pada ekstrak akar kalakai pada tanah pasir dengan persamaan linear  $y = 0,688x + 33,187$ , didapat  $IC_{50}$  sebesar 24,40 ppm. Hasil  $IC_{50}$  kedua ekstrak tersebut termasuk dalam golongan antioksidan yang sangat aktif (Jun *et al.*, 2003). Terdapat perbedaan aktivitas antioksidan pada akar kalakai yang berbeda kondisi tempat tumbuh. Kemampuan aktivitas antioksidan terbesar terdapat pada akar kalakai yang berasal dari tanah gambut yang ditunjukkan dengan kecilnya nilai  $IC_{50}$ . Semakin kecil nilai  $IC_{50}$ , maka semakin kuat aktivitas antioksidannya. Perbedaan tersebut disebabkan adanya perbedaan tempat tumbuh yang dipengaruhi perbedaan nutrisi yang terdapat pada dua jenis tanah yang berbeda tersebut (Rohaeti *et al.*, 2011). Akar kalakai tumbuh optimum pada daerah yang memiliki kelembaban tinggi seperti lahan gambut (Shinta dan Atyk, 2011). Faktor yang juga dapat berpengaruh yaitu temperatur, tingkat kebasahan tanah, intensitas sinar matahari, dan kadar  $CO_2$  pada daerah sekitar tumbuhan (Neldawati *et al.*, 2013).

### Kesimpulan

Hasil uji aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol akar kalakai yang tumbuh pada tanah pasir dan tanah gambut memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat. Hal tersebut ditandai dengan nilai  $IC_{50}$  pada ekstrak etanol akar kalakai tanah gambut sebesar 19,06 ppm dan ekstrak etanol akar kalakai tanah pasir sebesar 24,40 ppm.





## Bab 9

### Studi *in vivo* dan *in vitro* tentang Pengaruh Ekstrak Tanaman terhadap Sel Kanker Lidah

#### A. Studi *in vitro* Pengaruh Bawang Dayak terhadap Migrasi Sel Kanker Lidah

---

Karsinoma sel skuamosa oral (OSCC) adalah jenis kanker mulut yang paling umum secara histologis yang muncul dari sel epitel skuamosa dalam rongga mulut. Kanker ini umumnya menyerang dasar mulut dan lidah. Berbagai cara pengobatan dikembangkan untuk menangani OSCC, termasuk kemoterapi, radioterapi, pembedahan, atau kombinasinya. Namun, pengobatan ini menyebabkan banyak efek samping.

Penemuan dan pengembangan agen terapi baru yang berasal dari sumber alami, terutama tanaman dengan efek samping yang lebih sedikit akhir-akhir ini menjadi salah satu fokus utama dalam penelitian onkologi. Beberapa tanaman telah dilaporkan memiliki efek antikanker, termasuk *Brucea javanica*, *Cinnamomum cassia*, *Myristica fragrans*, dan *Oroxylum indicum*. Tanaman telah dikenal sebagai sumber yang kaya akan berbagai senyawa aktif, termasuk flavonoid, yang dilaporkan dapat menghambat proliferasi kanker melalui penghambatan siklus sel,

aktivitas antiproliferatif dan antioksidatif, induksi apoptosis, peningkatan diferensiasi, penghambatan angiogenesis dan aktivasi metabolisme karsinogen, dan modulasi resistensi multidrug. Selain itu, beberapa senyawa fenolik nonflavonoid juga telah dilaporkan memiliki sifat antikanker, seperti asam caffeic.

*Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. adalah tanaman obat tradisional yang termasuk dalam keluarga Iridaceae. Umbinya biasa digunakan untuk pengobatan kanker payudara, hipertensi, stroke, dan diabetes melitus. Selain itu juga digunakan untuk meningkatkan produksi ASI dan mengobati gangguan seksual. Umbi *E. bulbosa* juga dilaporkan memiliki aktivitas antimikroba dan antioksidan.

*Eleutherine bulbosa* mengandung berbagai macam senyawa, terutama naftokuinon, antrakuinon, dan naftalen. Senyawa utama yang ditemukan dalam tanaman ini adalah eleutherin, isoeleutherin, dan eleutherol. Beberapa senyawa yang diperoleh dari umbi *E. bulbosa* telah dilaporkan menunjukkan aktivitas antikanker, seperti 6,8-hidroksi-3,4-di-metoksi-1-metil-antrakuinon-2-asam karboksilat metil ester, eleutherinosida C, dan isoeleutherin.

Ekstrak umbi *Eleutherine bulbosa* (EBBE) telah dilaporkan menunjukkan sitotoksitas terhadap beberapa jenis kanker pada manusia, seperti kanker serviks (line HeLa), kanker usus besar (line SW480, HCT116, DLD1, WiDr), kanker payudara (line T47D), leukemia (line K562), dan retinoblastoma (WERI-Rb-1). Namun, efek sitotoksik EBBE terhadap sel kanker lidah manusia belum diteliti. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi efek EBBE terhadap viabilitas, apoptosis, dan aktivitas migrasi sel kanker lidah.

## **Bahan dan Metode**

### **Persiapan ekstrak umbi *E. bulbosa* (EBBE)**

Umbi *E. bulbosa* diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik Indonesia (Balitbu Tropika), Indonesia. Identifikasi tanaman dilakukan oleh ahli botani di Pusat Penelitian Konservasi Tumbuhan dan Kebun Raya, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Indonesia (No.

B-1269/IPH.3/KS/X/2020). EBBE diekstraksi dengan metode maserasi. Secara singkat, umbi *E. bulbosa* dicincang dan dikeringkan. Bahan kering diekstraksi dengan etanol 70%, disaring dan diuapkan menggunakan rotary evaporator. EBBE kasar yang dihasilkan kemudian disimpan pada suhu 4°C.

Kultur sel HSC-3 dilakukan seperti yang telah dijelaskan sebelumnya dengan modifikasi. Lini sel HSC-3 dibeli dari Sigma-Aldrich Pte. Ltd. (St. Louis, MO, USA). Sel HSC-3 dikultur dalam medium lengkap yang mengandung Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich), 10% serum bovine fetal (FBS) (PAN-Biotech, Aidenbach, Jerman), 50 U/mL penisilin dan 50 µg/mL streptomisin (Sigma-Aldrich) dalam inkubator berhumiditas 5% CO<sub>2</sub> pada suhu 37°C. Sel HSC-3 kemudian dipisahkan dengan larutan tripsin-asam etilendiamintetraasetat (EDTA) (Sigma-Aldrich) setelah mencapai konfluensi 80%. Setelah mencapai jumlah sel yang diinginkan, sel HSC-3 ditanam ke dalam plat 24-sumur dan plat 96-sumur untuk pengujian lebih lanjut.

### **Uji viabilitas sel**

Jumlah sel hidup diukur secara kuantitatif menggunakan uji 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida (MTT) seperti yang telah dijelaskan sebelumnya dengan modifikasi. Secara singkat, 5 × 10<sup>3</sup> sel HSC-3 ditanam ke dalam plat 96-sumur dan kemudian diberi perlakuan dengan EBBE (1, 10, atau 100 µg/mL), 1 µM Doxorubicin (Dankos Farma, Jakarta, Indonesia) atau hanya medium selama 24 jam. Setelah itu, 100 µL MTT (Sigma-Aldrich) dalam medium kultur ditambahkan ke setiap sumur. Setelah menginkubasi plat selama 4 jam, medium kultur dibuang, dan kristal formazan yang terbentuk dilarutkan dalam 100 µL dimetilsulfoksida (DMSO). Hasil diukur pada OD570 menggunakan pembaca mikroplat (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Setiap kelompok eksperimen diukur dalam enam ulangan. Selain itu, jumlah sel yang tidak diberi perlakuan dihitung dengan hemositometer dan digunakan untuk menginterpolasi nilai OD570 sel HSC-3.

### **Uji Sub-G1**

Untuk menyelidiki efek sitotoksik EBBE pada sel HSC-3, jumlah sel apoptosis ditentukan menggunakan uji sub-G1 seperti yang telah dijelaskan sebelumnya dengan modifikasi. Sel HSC-3 yang diberi perlakuan dan tidak diberi perlakuan dipanen dan disuspensi dalam 450  $\mu$ L larutan fluorokrom hipotonik yang mengandung 50  $\mu$ g/mL propidium iodida (Sigma-Aldrich), 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich), dan 0,1% natrium sitrat (Wako, Osaka, Jepang). Setelah itu, suspensi sel diinkubasi dalam gelap selama 2 jam pada suhu ruangan. Fluoresensi dari masing-masing inti sel diukur menggunakan flow sitometer FACSCanto II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) pada 100.000 kejadian.

### **Uji Gores (Scratch assay)**

Uji gores dilakukan seperti yang telah dijelaskan sebelumnya. Sel HSC-3 ( $5 \times 10^4$ ) ditanam ke dalam plat 24-sumur dan diinkubasi semalam. Goresan dibuat pada setiap sumur dengan ujung pipet mikro kuning. Kemudian, sumur-sumur tersebut dicuci dengan larutan penyangga fosfat (PBS) (Wako) dan diberi perlakuan dengan/tanpa EBBE atau 20  $\mu$ M cyclopamine tartrate (BioVision, Milpitas, CA, USA) (sebagai kontrol positif) selama 24 jam. Penutupan celah diamati dan didokumentasikan di bawah mikroskop cahaya terbalik (Carl Zeiss, Jena, Jerman)

### **Uji Transwell**

Uji transwell dilakukan seperti yang telah dijelaskan sebelumnya dengan modifikasi. Sel HSC-3 ( $5 \times 10^4$ ) ditanam dalam sisipan ruang dengan ukuran pori 8  $\mu$ m (Merck, Darmstadt, Jerman). Setelah itu, 800  $\mu$ L medium kultur dengan/tanpa EBBE atau 20  $\mu$ M cyclopamine tartrate dimasukkan ke dalam setiap sumur pada plat 24-sumur. Sisipan ruang yang berisi sel HSC-3 kemudian ditempatkan pada plat 24-sumur. Setelah menginkubasi ruang tersebut selama 24 jam pada suhu 37°C, sel-sel yang bermigrasi di permukaan bawah ruang difiksasi. Sel-sel tersebut dihitung dan didokumentasikan di bawah mikroskop cahaya terbalik.

## **Immunoblotting**

Tingkat ekspresi protein Sonic hedgehog (SHH) diukur menggunakan metode immunoblotting seperti yang telah dijelaskan sebelumnya dengan modifikasi. Sel HSC-3 dilisis dan dihomogenisasi dengan buffer sampel Laemmli (Bio-Rad). Protein dari setiap kelompok eksperimen dipisahkan dengan elektroforesis gel poliakrilamida-sodium dodesil sulfat (SDS-PAGE) dan ditransfer ke lembaran polivinilidena difluorida (PVDF). Setelah pemblokiran dengan larutan susu skim 5%, lembaran tersebut diinkubasi dengan antibodi monoklonal kelinci anti-SHH sebagai antibodi primer dan antibodi kambing anti-kelinci yang dikonjugasi dengan horseradish peroksidase (HRP) sebagai antibodi sekunder (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Hasil immunoblot dianalisis menggunakan perangkat lunak ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) untuk mengukur densitas setiap pita SHH.

## **Analisis statistik**

Analisis statistik dilakukan menggunakan IBM SPSS Statistics versi 26.0 (SPSS IBM, Armonk, NY, USA). Uji Shapiro-Wilk digunakan sebagai uji normalitas. Perbedaan hasil uji MTT, uji sub-G1, dan uji gores antara kelompok eksperimen dianalisis menggunakan Kruskal-Wallis H dengan analisis post hoc Mann-Whitney U. Sementara itu, perbedaan hasil uji transwell dan densitas pita SHH antara kelompok eksperimen dianalisis menggunakan analisis varians satu arah (ANOVA) dengan analisis post hoc Tukey's honestly significant difference (HSD). Semua hasil dinyatakan sebagai rata-rata  $\pm$  standar deviasi (SD). Nilai  $P < 0,05$  dianggap signifikan secara statistik.

## **Hasil**

### **EBBE mengurangi jumlah sel HSC-3 yang hidup**

Jumlah sel HSC-3 yang hidup yang dikultur dalam medium yang mengandung pelarut ekstrak (kelompok sham) selama 24 jam adalah  $9.607 \pm 13,81$ . Perlakuan dengan EBBE menunjukkan bahwa viabilitas sel HSC-3 secara signifikan lebih rendah dibandingkan dengan kelompok sham ( $P < 0,05$ ) dengan cara yang bergantung pada konsentrasi. Jumlah

sel HSC-3 yang hidup yang diberi perlakuan dengan 1, 10, dan 100 µg/mL EBBE masing-masing adalah  $9.055 \pm 268,69$ ,  $6.777 \pm 278,04$ , dan  $3.659 \pm 32,86$ . Viabilitas sel HSC-3 yang diberi perlakuan EBBE secara signifikan lebih tinggi ( $P < 0,05$ ) dibandingkan dengan sel HSC-3 yang diberi perlakuan Doxorubicin ( $226 \pm 32,34$ ). Temuan ini menunjukkan bahwa EBBE dapat mengurangi viabilitas sel HSC-3.

### **EBBE menginduksi apoptosis sel HSC-3**

Hasil uji Sub-G1 menunjukkan bahwa persentase apoptosis kelompok sham adalah  $8,27 \pm 0,14\%$ . Sel HSC-3 yang mengalami apoptosis secara signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok sham ( $P < 0,05$ ) dengan cara yang bergantung pada konsentrasi setelah perlakuan EBBE. Persentase apoptosis sel HSC-3 yang diberi perlakuan dengan 1, 10, dan 100 µg/mL EBBE masing-masing adalah  $9,60 \pm 0,35\%$ ,  $17,78 \pm 0,32\%$ , dan  $38,64 \pm 0,70\%$ . Persentase ini secara signifikan lebih rendah ( $P < 0,05$ ) dibandingkan dengan sel HSC-3 yang diberi perlakuan Doxorubicin ( $95,95 \pm 2,60\%$ ). Oleh karena itu, hasil ini menunjukkan bahwa perlakuan EBBE dapat meningkatkan apoptosis sel HSC-3.

### **EBBE menghambat migrasi sel HSC-3**

Persentase penutupan celah sel HSC-3 yang dikultur dalam medium yang mengandung pelarut ekstrak setelah 24 jam adalah  $96,11 \pm 4,17\%$ . Setelah perlakuan EBBE, aktivitas migrasi sel HSC-3 secara signifikan lebih rendah dibandingkan dengan kelompok sham ( $P < 0,05$ ) dengan cara yang bergantung pada konsentrasi. Persentase penutupan celah sel HSC-3 yang diberi perlakuan dengan 1, 10, dan 100 µg/mL EBBE masing-masing adalah  $89,56 \pm 5,77\%$ ,  $76,78 \pm 4,87\%$ , dan  $60,67 \pm 7,62\%$ . Persentase ini secara signifikan lebih tinggi ( $P < 0,05$ ) dibandingkan dengan sel HSC-3 yang diberi perlakuan cyclopamine tartrate ( $43,00 \pm 4,82\%$ ).

Uji transwell juga menunjukkan hasil yang serupa. Jumlah sel HSC-3 yang bermigrasi dalam kelompok sham adalah  $134,44 \pm 11,60$ . Jumlah HSC-3 yang bermigrasi sel secara signifikan lebih rendah daripada kelompok sham ( $P < 0,05$ ) dengan cara yang bergantung pada konsentrasi setelah perawatan EBBE. Jumlah sel HSC3 yang bermigrasi

yang diobati dengan 1, 10, dan 100  $\mu\text{g} / \text{mL}$  EBBE adalah  $107.44 \pm 15.21$ ,  $95.11 \pm 6.01$ , dan  $39.22 \pm 3.56$ , masing-masing. Angka-angka ini secara signifikan lebih tinggi ( $P < 0,05$ ) dibandingkan dengan yang diobati dengan siklopamin tartrat Sel HSC-3 ( $17,89 \pm 3,22$ ) (Gbr. 4). Secara keseluruhan, hasil ini menunjukkan bahwa EBBE menunjukkan efek antimigratory terhadap sel HSC-3.

### **EBBE menurunkan regulasi ekspresi SHH**

Setelah penambahan EBBE, tingkat ekspresi SHH pada sel HSC-3 menurun secara bergantung pada konsentrasi. Tingkat ekspresi SHH pada sel HSC-3 yang diobati dengan 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EBBE secara signifikan lebih tinggi ( $P < 0,05$ ), sementara tingkat ekspresi SHH pada sel HSC-3 yang diobati dengan 10 dan 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EBBE secara signifikan lebih rendah ( $P < 0,05$ ) dibandingkan dengan kelompok kontrol. Tingkat ekspresi SHH pada sel HSC-3 yang diobati dengan 1 dan 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EBBE secara signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan sel HSC-3 yang diobati dengan siklopamin tartrat ( $P < 0,05$ ). Namun, tidak ada perbedaan signifikan yang diamati pada tingkat ekspresi SHH antara pengobatan siklopamin tartrat dan EBBE 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $P = 0,142$ ). Dengan demikian, temuan ini menunjukkan bahwa EBBE dapat menurunkan ekspresi SHH.

### **Pembahasan**

Dalam penelitian ini, kami menyelidiki potensi EBBE sebagai agen antikanker untuk pengobatan OSCC. EBBE menunjukkan efek sitotoksik terhadap sel HSC-3 dengan mengurangi viabilitas sel HSC-3 secara bergantung pada konsentrasi. Berdasarkan hasil uji sub-G1, penurunan viabilitas sel HSC-3 disebabkan oleh apoptosis. Hasil ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa EBBE mampu menginduksi apoptosis pada sel kanker. EBBE juga dilaporkan dapat menghambat siklus sel pada beberapa garis sel yang mengindikasikan bahwa EBBE mungkin menginduksi apoptosis pada sel HSC-3 melalui penahanan siklus sel karena kedua proses tersebut saling berhubungan. Berdasarkan studi docking molekuler, eleutherol, eleutherin, dan

isoeleutherin dapat menginduksi apoptosis dengan mengaktifkan caspase-827.

Migrasi sel adalah salah satu proses kunci yang terlibat dalam metastasis kanker. Uji scratch dan transwell menunjukkan bahwa EBBE menahan migrasi sel HSC-3 secara bergantung pada konsentrasi. Hal ini menunjukkan aktivitas baru dari EBBE dalam menghambat migrasi sel HSC-3. Oleh karena itu, EBBE mungkin memiliki aktivitas anti-metastasis terhadap sel kanker lidah.

Metastasis kanker lidah diatur oleh beberapa protein, termasuk SHH. Salah satu jalur pensinyalan SHH yang dilaporkan mengatur migrasi sel pada kanker lidah adalah SHH/glioma-associated oncogene homologue (SHH/GLI). Protein SHH berikatan dan menginaktivasi reseptornya, Patched 1 (PTCH1). Interaksi ini menyebabkan aktivasi faktor transkripsi dari keluarga GLI, yang berperan penting dalam mengatur migrasi, invasi, dan proliferasi kanker.

Penelitian ini mengungkapkan bahwa EBBE menurunkan tingkat ekspresi SHH seiring dengan peningkatan konsentrasi EBBE, menunjukkan bahwa efek penghambatan EBBE terhadap ekspresi SHH mungkin berperan dalam sifat anti-migrasinya. Sejauh yang kami ketahui, ini adalah penelitian pertama yang menunjukkan penurunan ekspresi SHH pada sel HSC-3 yang diobati dengan EBBE. EBBE mungkin menghambat migrasi sel HSC-3 melalui penghambatan jalur pensinyalan SHH/GLI. Kemungkinan semua jalur pensinyalan yang diatur oleh SHH dapat dihambat oleh EBBE. EBBE juga mungkin menahan migrasi sel HSC-3 melalui jalur lain. Pada garis sel kanker usus besar SW480, eleutherinoside C dan isoeleutherin yang diperoleh dari umbi *E. bulbosa* dilaporkan menghambat jalur Wnt/ $\beta$ -catenin, yang diketahui berperan penting dalam mengatur migrasi kanker. Oleh karena itu, jalur pensinyalan yang terlibat dalam penghambatan migrasi sel HSC-3 oleh EBBE masih perlu dieksplorasi. Selain itu, komponen pensinyalan hilir dari SHH dan molekul target yang dipengaruhi oleh EBBE harus diidentifikasi. Karena EBBE juga mengandung berbagai senyawa bioaktif, penelitian lebih lanjut diperlukan

untuk mengidentifikasi senyawa mana yang bertanggung jawab atas aktivitas apoptosis dan anti-migrasi. Oleh karena itu, diperlukan investigasi lebih lanjut untuk memahami mekanisme molekuler yang mendasari apoptosis sel HSC-3 yang diinduksi oleh EBBE dan mengonfirmasi jalur pensinyalan SHH mana yang berkontribusi pada penghambatan migrasi sel oleh EBBE.

## B. Studi *in vivo* Ekstrak Etanolik Ciplukan dalam Meningkatkan Apoptosis Sel Kanker Lidah

Kanker lidah merupakan salah satu jenis kanker di dalam rongga mulut yang memiliki prevalensi tinggi atau sering terjadi dibandingkan kanker di rongga mulut lainnya. Kanker lidah adalah kanker primer kedua terbanyak setelah kanker bibir. Dari 441 kanker lidah, 25% terjadi pada wanita dan 75% terjadi pada pria. Berdasarkan hasil analisis Rischesdas 2007, Jawa Tengah memiliki prevalensi kanker rongga mulut dan tenggorokan terbanyak dari 203 kasus yang terjadi di Indonesia, yaitu sebesar 0,2%.4 Faktor yang mempengaruhi terjadinya kanker lidah yaitu faktor lokal meliputi kebersihan rongga mulut yang buruk, iritasi kronis dari restorasi, dan karies gigi, sedangkan faktor luar antara lain kebiasaan merokok, minum alkohol menyirih, virus, serta faktor host meliputi usia jenis kelamin, nutrisi, sistem imun, dan genetik. Oleh sebab itu harus diusahakan pemilihan pengobatan kanker lidah yang baik dan efektif.

Peningkatan apoptosis merupakan salah satu target dalam pengobatan kanker lidah. Apoptosis merupakan suatu proses seluler yang terjadi baik dalam keadaan siologis dan patologis untuk mengatur jumlah sel. Pada sel normal, jumlah sel diatur oleh keseimbangan pembelahan sel (proliferasi) dan kematian sel (apoptosis). Tidak terkontrolnya pembelahan sel yang terjadi akan menyebabkan kanker.

7,12-dimetilbenz[a]antracen (DMBA) merupakan golongan Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) yang diketahui bersifat sebagai karsinogen pada manusia. Oksidasi metabolik DMBA akan menghasilkan metabolik epoksida yang sangat reaktif sehingga mampu memicu karsinogenesis.

Metabolit reaktif DMBA akan membentuk adduct pada DNA sehingga terjadi mutasi DNA yang menyebabkan perubahan sifat sel-sel normal menjadi sel kanker yang tak terkontrol.

Beberapa peneliti melaporkan bahwa senyawa-senyawa dalam tanaman memiliki potensi sebagai agen kemopreventif sehingga dapat mengurangi resiko kanker. Salah satu tanaman yang menarik untuk ditelusuri aktivitasnya sebagai agen kemopreventif adalah ciplukan (*Physalis angulata* L.). Senyawa aktif yang diduga sebagai antikanker pada herba ciplukan adalah salin. Ekstrak etanolik herba ciplukan (EEC) secara *in vitro* memiliki aktivitas sitotoksik dan mampu menginduksi terjadinya apoptosis pada sel kanker leher rahim HeLa dan sel kanker payudara MCF-7. Fisalin B dan salin D memberikan aktivitas sitotoksik pada beberapa sel kanker.

Untuk mengoptimalkan potensi ciplukan sebagai agen kemoprevensi terutama pada kanker lidah, maka tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh EEC terhadap peningkatan apoptosis sel kanker lidah tikus Sprague Dawley yang diinjeksi DMBA 2%. Apabila terbukti bahwa EEC dapat menghambat karsinogenesis pada sel kanker lidah, maka herba ini dapat dikembangkan sebagai salah satu alternatif agen kemoprevensi.

### **Metode Penelitian**

Disain penelitian adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan mengamati aktivitas apoptosis sel kanker lidah tikus yang diinjeksi DMBA dengan perlakuan EEC 750 dan 1500 mg/ kg BB. Ethical clearance diperoleh dari Komisi Etik Penelitian FKG UGM No. 706/KKEP/FGK-UGM/ EC/2014.

Penelitian berjalan selama empat bulan pada bulan Januari sampai April 2015 di Laboratoium Taksonomi Tanaman Bawah Fakultas Biologi UGM, Laboratorium Farmasi Fakultas Farmasi UGM, Laboratorium Pengujian dan Penelitian Terpadu UGM, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UGM, Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM.

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah herba ciplukan terdiri dari semua bagian tanaman kecuali akar (*Physalis angulata* L.) yang diambil dari daerah Ngaglik, Sleman, Yogyakarta pada bulan Februari 2015 dan dideterminasi di laboratorium Taksonomi Tumbuhan Bawah, Fakultas Biologi UGM. Pembuatan EEC dilakukan dengan teknik maserasi di Laboratorium Farmasi Fakultas Farmasi UGM. Herba ciplukan yang sudah dibuat serbuk akan diekstraksi dalam larutan 1,5 liter etanol 96%, kemudian ekstrak yang sudah jadi akan dipekatkan dengan bantuan rotary evaporator. Ekstrak ini kemudian akan diencerkan dengan akuades untuk memperoleh dosis 750 mg/ kg BB dan 1500 mg/kg BB.

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus betina galur Sprague Dawley berumur 2-3 bulan dengan berat 80-160 gram sebanyak 15 ekor yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu UGM. Sebanyak 5 ekor pada tiap kelompok (3 kelompok) yang ditempatkan dalam kandang dengan suhu sekitar 28-32 °C, kelembaban nisbi 98% dan diberikan minum ad libitum dan makanan berupa pellet. Tikus akan diadaptasi selama 3 hari..

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah 7,12 dimetilbenz (a) antrasen atau DMBA (Sigma) sebagai bahan untuk induksi kanker, aseton sebagai pelarut DMBA, etanol sebagai pelarut herba ciplukan, akuades sebagai pelarut ekstrak, formaldehid (Sigma) sebagai larutan ksasi organ, TUNEL sebagai pewarnaan untuk melihat apoptosis.

## **Prosedur Penelitian**

### **Uji *in vivo***

Dalam penelitian ini, perlakuan terhadap hewan uji dilakukan untuk melihat peningkatan apoptosis karena pemberian DMBA dan ekstrak etanolik herba ciplukan pada sel kanker lidah. Tikus dibagi dalam tiga kelompok masing-masing kelompok terdiri dari lima ekor tikus. Kelompok (1) kelompok DMBA+EEC dosis 750 mg/kg BB; (2) kelompok kontrol DMBA + EEC dosis 1500 mg/ kgBB (3) kelompok kontrol DMBA. Kanker lidah diinduksi dengan injeksi secara intrasubmukosa 0,1 ml per 100 gram BB tikus larutan DMBA 2% sebanyak satu kali pada bagian lateral lidah

hewan uji, lalu didiamkan selama 5 minggu. Perlakuan EEC 750 dan 1500 mg/kg BB diberikan secara sondasi kepada hewan uji pada awal minggu keenam selama 7 hari. Pada akhir perlakuan, yaitu pada minggu ketujuh tikus dikorbankan dan diambil jaringan lidahnya.

### **Pengamatan apoptosis sel dengan pewarnaan TUNEL**

Deparanasi dilakukan sebelum potongan preparat jaringan lidah yang terblok parafin dicat menggunakan TUNEL Assay, bertujuan untuk mengilangkan parafin. Potongan preparat jaringan lidah dimasukkan ke dalam larutan xylol selama 3 menit. Setelah itu dimasukkan ke dalam alkohol dengan konsentrasi bertingkat 95%, 90%, 80%, 70% (masing-masing konsentrasi direndam selama 5 menit). Selanjutnya preparat dicuci menggunakan air mengalir sampai sisa alkohol hilang, lalu dicuci menggunakan PBS selama 15 menit, kemudian dicuci menggunakan akuades selama 2 menit kemudian diinkubasi semalam di inkubator pada suhu 45 °C. Setelah itu dilakukan rehidrasi preparat jaringan lidah dengan akuades steril, kemudian ditambah dengan 50 µl TUNEL label mix (enzyme solution dengan µl labeling solution) dengan TdT. Preparat ditutup dengan siliconized cover slip. Preparat diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit di dalam moist chamber, hal ini dapat dilakukan karena merupakan reaksi enzimatik. Preparat dicuci dengan Phosphate Buffered Saline (PBS) sebanyak 3 kali dan diinkubasi dengan RNase solution pada suhu 37 °C selama 30 menit, lalu preparat dicuci lagi dengan PBS sebanyak 3 kali. Preparat selanjutnya diinkubasi dengan larutan propidium iodide pada suhu ruang selama 10 menit. Preparat dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali dan ditutup dengan cover slide diameter 18 mm.

Pengamatan apoptosis dilakukan dengan menggunakan mikroskop fluoresen dengan perbesaran 400x. Sel apoptosis yang dihitung adalah sel yang berwarna hijau dan sel tunggal pada 1000 sel dalam 1 lapang pandang. Perhitungan yang dilakukan pada 10 lapang pandang yang berbeda. Sel yang mengalami apoptosis akan mengalami fluoresensi warna hijau. Pemeriksaan dilakukan di bawah mikroskop fluoresen (Zeiss®) di LPPT UGM. Setelah itu dilakukan perhitungan indeks apoptosis.

## **Analisis data**

Data pengamatan nilai apoptosis antar kelompok dianalisis menggunakan ANOVA (SPSS versi 16). Metode statistik yang digunakan adalah statistik parametrik dengan uji Kolmogorov – Smirnov untuk uji normalitas (bila nilai signifikansi lebih dari 0,05 maka data terdistribusi normal), lalu dilanjutkan dengan uji homogenitas varian menggunakan homogeneity of variances test (bila nilai signifikansi lebih dari 0,05 maka varian dari dua data atau lebih populasi data adalah sama), setelah itu dilakukan uji one way-ANOVA dan uji lanjut post-hoc test Tukey HSD dengan taraf kepercayaan 95%.

## **Hasil Penelitian**

Injeksi 2% DMBA dengan dosis 0,1 ml/kg BB pada lateral lidah tikus galur Spague dawley mengakibatkan timbulnya ulkus yang berwarna kemerahan disertai indurasi pada pemeriksaan klinis. Pada pengecatan HE, gambaran histologis lidah tikus menunjukkan adanya displasia epitel yang ditandai dengan pemanjangan epitel dan inti sel yang hiperkromatis.

Hasil pengecatan TUNEL menunjukkan bahwa apoptosis kelompok perlakuan EEC dengan dosis 1500 mg/kg BB memiliki jumlah apoptosis paling banyak jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan EEC 750 mg/kg BB dan kelompok kontrol.

## **Indeks Apoptosis**

Indeks apoptosis dihitung menggunakan rumus:

$$IA = (\text{sel apoptosis} / \text{total sel}) \times 100\%$$

Hasil perhitungan indeks apoptosis menunjukkan bahwa indeks apoptosis tertinggi adalah pada kelompok perlakuan ekstrak 1500 mg/kg BB yaitu sebesar 10,81%, kemudian kelompok perlakuan ekstrak 750 mg/kg BB yaitu sebesar 9,41%, dan yang terendah adalah indeks apoptosis pada kelompok kontrol, yaitu sebesar 3,94%.

## Analisis Statistik

**Tabel 1.** Rangkuman hasil uji Tukey HSD

Signifikansi Tukey	DMBA+EEC 750 mg/ kgBB	DMBA+EEC 1500 mg/ kgBB
DMBA	0,000*	0,000*
DMBA+EEC 750mg/ kgBB	-	0,001*

\*berbeda signifikan dengan  $p < 0,05$

Secara statistik, hasil kuantifikasi indeks apoptosis masing-masing kelompok perlakuan dalam penelitian ini menunjukkan hasil yang terdistribusi normal dan homogen. Hasil uji One Way ANOVA menunjukkan nilai 0,000 ( $p < 0,05$ ) yang artinya terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok. Hal ini mengindikasikan bahwa EEC mampu meningkatkan indeks apoptosis kanker lidah tikus yang diinduksi DMBA. Setelah dilakukan uji One Way ANOVA dilanjutkan uji post-hoc Tukey HSD. Nilai signifikansi uji analisis statistik menggunakan Tukey test dapat dilihat pada Tabel 1.

Pada Tabel 1 terlihat kelompok kontrol DMBA berbeda secara signifikan dengan kelompok perlakuan EEC 750 mg/kg BB dan EEC 1500 mg/kg BB yang artinya EEC mampu meningkatkan indeks apoptosis kanker lidah tikus yang diinduksi DMBA. Perlakuan EEC 750 mg/kg BB berbeda secara signifikan dengan perlakuan ekstrak 1500 mg/kg BB yang artinya EEC 1500 mg/kg BB lebih efektif meningkatkan indeks apoptosis dibandingkan EEC 750 mg/kg BB.

## Pembahasan

Pada penelitian ini teknik penyuntikan secara intrasubmukosa di lateral lidah dengan 7,12-Dimetilbenz[a]antrasena (DMBA) pada lidah tikus Sprague dawley pertama kali dilakukan, sebelumnya teknik ini dilakukan pada hewan uji lidah hamster. Pemberian (DMBA) pada tikus selama 5 minggu menyebabkan tikus mengalami fase prekanker. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Chino dkk., bahwa DMBA 0,25% yang dipaparkan pada lidah hamster secara intrasubmukosa mampu menginduksi terjadinya

kanker lidah. Metabolit DMBA bersifat elektrofilik, sangat reaktif, dan mampu bereaksi dengan makromolekul di dalam tubuh (seperti DNA, RNA, dan protein) yang bersifat nukleofilik dengan membentuk ikatan kovalen. Ikatan kovalen adalah awal dari stress sel yang akan menyebabkan kerusakan kromosom, kesalahan replikasi DNA, dan pembelahan yang tidak wajar yang mengakibatkan perubahan sifat sel-sel normal menjadi sel kanker yang tidak terkendali.

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya peningkatan apoptosis pada sel prekanker lidah. Hal ini disebabkan zat aktif dalam ciplukan berupa salin dapat meningkatkan terjadinya apoptosis pada sel. Ekstrak etanolik herba ciplukan mampu menginduksi apoptosis melalui penurunan membran potensial mitokondria dan perubahan permeabilitas membran mitokondria sehingga terjadi kerusakan mitokondria yang akan memicu penurunan protein Bcl dan meningkatkan gen p53 yang selanjutnya akan mengaktifkan protein proapoptosis sehingga terjadi apoptosis. Hasil penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan Monikawati, bahwa fisalin F mampu memicu terjadinya apoptosis pada sel T-47D kanker payudara melalui mekanisme pengaktifan kaspase-3.<sup>16</sup> Hal ini sesuai dengan penelitian Wu dkk., bahwa pemberian EEC mampu menurunkan ekspresi protein Bcl-2. Hasil tersebut mendukung penelitian *in vitro* yang dilakukan oleh Lee dkk., bahwa EEC mampu menginduksi apoptosis pada sel HSC-3 (human oral cancer cells) melalui penurunan membran potensial mitokondria, perubahan permeabilitas membran mitokondria, serta penurunan protein ekspresi protein Bcl-2 sehingga memicu terjadinya apoptosis. Peningkatan apoptosis ini dapat menjadi salah satu target dalam pengobatan kanker lidah, sehingga perlu penelitian biomolekuler lebih lanjut untuk mengetahui keterlibatan molekuler terkait dengan mekanisme EEC menginduksi apoptosis pada sel kanker lidah.

### **Kesimpulan**

Dari penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa pemberian EEC 750 dan 1500 mg/kg BB mampu meningkatkan apoptosis pada kanker lidah tikus yang diinduksi DMBA sehingga EEC ini dapat dijadikan salah satu

alternatif dalam pengobatan kanker lidah. Perlu dilakukan penelitian mengenai ekspresi gen p53 setelah pemberian EEC pada tikus Sprague Dawley.



## Bab 10

### Telaah Ekstrak Herbal dalam Pengobatan Penyakit Lain

#### A. Potensi Ekstrak Kelakai Terhadap Kadar Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- $\alpha$ ) pada Mencit yang Diinfeksi Plasmodium berghei

Malaria masih menjadi masalah kesehatan utama di sebagian besar negara tropis dan subtropis di dunia. Setiap tahun diperkirakan 300-500 juta jiwa telah terinfeksi dengan angka kematian mencapai 1,5-2,5 juta jiwa (Mohanty *et al*, 2005). Menurut *World Health Organization* (WHO) dalam *World Malaria Report* (2013) pada tahun 2012 disebutkan bahwa terdapat 207 juta kasus malaria di seluruh dunia . Kasus kematian mencapai 627 ribu dengan kematian pada anak usia < 5 tahun sebanyak 482 ribu (77%). Di Asia tenggara terdapat 28 juta kasus malaria dengan angka kematian sebanyak 38 ribu dengan 95% kematian terjadi di 3 negara yaitu Indonesia, India, dan Myanmar. Di Indonesia terdapat 6 juta kasus klinis malaria dengan kematian sebanyak 700 orang per tahun. Dinas Kesehatan Provinsi Kalimantan Selatan hingga tahun 2015 mencatat ada 155 desa dan kelurahan (10% jumlah desa dan kelurahan di Kalimantan Selatan) serta 1 kabupaten masuk kategori merah penyakit malaria. Kasus malaria

di Kalsel selama Januari-Maret 2015 sebanyak 4.838 kasus dengan satu orang meninggal dunia.

Malaria yang disebabkan oleh *P. falciparum* adalah jenis penyakit parasit yang paling mematikan di dunia. Diperkirakan 500 juta kasus klinis terjadi setiap tahun, dengan sekitar 1-2 juta kematian. Kira-kira 1-2% infeksi *P. falciparum* menyebabkan ancaman jiwa berupa komplikasi neurologis yang dikenal sebagai malaria serebral (MS). Eritrosit terinfeksi parasit yang pecah sewaktu proses skizogoni mengeluarkan berbagai toksin yang akan merangsang makrofag menghasilkan berbagai sitokin. Sitokin yang berperan penting pada pathogenesis malaria adalah TNF- $\alpha$ , limfotoksin, IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6, dan IL-10. Sitokin yang dihasilkan oleh makrofag merupakan respon imun non-spesifik yang ditujukan untuk menghambat pertumbuhan parasit dengan cara mengaktifkan leukosit untuk menghasilkan radikal bebas yang akan membunuh parasit. Sitokin juga berperan mengaktifkan sel-sel imun lain seperti limfosit T dan B, sel NK untuk berproliferasi dan menghasilkan lebih banyak lagi mediator kimia lain guna bekerjasama mengatasi infeksi.

Sistem imunitas innate merupakan garis pertama pertahanan host sebagai respon terhadap serbuan infeksi malaria. Respon inflamasi awal dan kuat pada malaria stadium darah adalah hal yang kritis untuk mengontrol stadium infeksi yang akut. Namun inflamasi yang berlebihan atau disregulasi melalui produksi sitokin pro-inflamasi, seperti TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , dan IL-6 dapat menuju pada sindrom malaria berat seperti anemia, MS dan gagal organ.

TNF- $\alpha$  selama infeksi malaria diduga memiliki efek protektif dan patogenik. Pada konsentrasi yang rendah, TNF- $\alpha$  menambah pembunuhan parasit melalui aktivasi makrofag oleh karena pelepasan sitokin. Dia juga bertanggungjawab terhadap terjadinya demam. Akan tetapi, konsentrasi tinggi TNF- $\alpha$  berhubungan dengan peningkatan insiden anemia, edem paru dan MS. Obat yang dapat mereduksi atau menghambat kerja TNF- $\alpha$  dapat mengurangi keparahan malaria.

Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f) Bedd) merupakan salah satu tanaman khas lahan rawa yang tumbuh di Kalimantan Selatan. Kelakai juga merupakan makanan favorit orang Dayak di Kalimantan Tengah. Berdasarkan bukti empirik, kelakai digunakan masyarakat suku Dayak Kenyah untuk mengobati anemia, pereda demam, dan sakit kulit. Kandungan zat bioaktif pada tumbuhan kelakai adalah flavonoid, steroid, dan alkaloid.

Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f) Bedd) mengandung senyawa flavonoid quercetin. Total flavonoid yang terkandung di dalam ekstrak kelakai adalah 14,5 µg/ml. Flavonoid adalah kelompok senyawa polifenol yang memiliki aktivitas scavenger radikal bebas, penghambat enzim hydrolitic dan oksidatif, serta anti-inflamasi. Flavonoid memiliki aktivitas antimalaria melalui penghambatan terhadap biosintesis asam lemak (FAS-II) parasit dan menghambat influx L-glutamin dan myoinositol kedalam eritrosit terinfeksi.

Respon inflamasi secara signifikan diperantarai oleh faktor transkripsi NF- $\kappa$ B dan dihambat oleh I $\kappa$ B. Aktivasi seluler diinduksi oleh fosforilasi protein I $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$  dan I $\kappa$ B $\beta$ ). Degradasi protein ini menyebabkan translokasi NF- $\kappa$ B ke inti sel yang kemudian berikatan dengan promotor spesifik pada area gen yang mengkode sitokin pro-inflamasi. Efek anti-inflamasi flavonoid quercetin terhadap sitokin proinflamasi TNF- $\alpha$  telah dilakukan. Flavonoid quercetin secara signifikan menurunkan pengaturan terhadap ekspresi gen NF- $\kappa$ B

Zat bioaktif lain pada kelakai adalah alkaloid dan steroid. Sebagai antipiretik, alkaloid dan steroid juga memiliki khasiat anti-inflamasi. Alkaloid pada tumbuhan piperine yang juga terkandung di dalam kelakai berfungsi sebagai antipiretik melalui penghambatan sintesis prostaglandin, sedangkan steroid menghambat aktivitas fosfolipase dan perubahan asam arakidonat menjadi prostaglandin, mengurangi kebocoran mikrovaskular, mencegah migrasi sel-sel piretik, dan menghambat produksi sitokin. Sampai saat ini penelitian potensi ekstrak kelakai terhadap malaria belum pernah dilakukan. Berdasarkan latar belakang di atas maka dilakukan

penelitian mengenai pengaruh pemberian ekstrak air kelakai terhadap malaria pada mencit Balb/c yang terinfeksi parasit malaria *P. berghei*, khususnya terhadap kadar TNF- $\alpha$ .

### **Metode Penelitian**

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental murni dengan Posttest-only with Control Group Design. Tanaman kelakai diperoleh dari Kecamatan Sungai Tabuk, Kalimantan Selatan yang dideterminasi di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru, Kalimantan Selatan. *Plasmodium berghei* yang digunakan dalam penelitian ini adalah galur ANKA yang diperoleh dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya. Mencit yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan galur BALB/c, usia lebih kurang 8 minggu dengan interval berat 25-30 gram, yang diperoleh dari peternakan hewan penelitian di Yogyakarta. Bahan perbandingan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bubuk artesunat yang diperoleh dari Bagian P2M Dinas Kesehatan Kota Banjarbaru, Kalimantan Selatan. Pelarut yang digunakan adalah DMSO 10% (Dimetil Sulfoksida) dan aqua destilata. Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak kelakai yang dibuat dengan cara maserasi dengan pelarut aqua destilata di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran UNLAM, Banjarbaru. Suspensi eritrosit terinfeksi *P.berghei* diinfeksi secara intraperitoneal kepada mencit uji sebanyak 200  $\mu$ l.

Dosis ekstrak kelakai sebagai bahan uji yang digunakan adalah 10 mg/kgbb/hari dan 100 mg/kgbb/hari berdasarkan penelitian pendahuluan dengan uji LD50. Pemberian ekstrak kelakai dan larutan artesunat selama 4 hari berdasarkan Peter's test.

Untuk dosis 100 mg/kgBB, dengan anggapan berat badan standar mencit adalah 25 g dan volume tiap pemberian adalah 200  $\mu$ l, banyaknya dosis pemberian 6 ekor x 4 kali pemberian untuk 4 hari x 4 kelompok perlakuan yang mendapat ekstrak kelakai sehingga diperlukan 96 dosis larutan. Untuk menghindari kekurangan dosis larutan pada saat perlakuan

dengan sonde, maka dibuat untuk 200 dosis. Ditimbang gel ekstrak kelakai sebanyak 500 mg kemudian ditambah 40 ml larutan DMSO 10%. Sehingga untuk setiap 200 µl larutan mengandung 2,5 mg ekstrak kelakai.

Untuk dosis 10 mg/kgBB, dengan anggapan berat badan standar mencit adalah 25 g dan volume tiap pemberian adalah 200 µl, banyaknya dosis pemberian 6 ekor x 4 kali pemberian untuk 4 hari x 4 kelompok perlakuan yang mendapat ekstrak kelakai sehingga diperlukan 96 dosis larutan. Untuk menghindari kekurangan dosis larutan pada saat perlakuan dengan sonde, maka dibuat untuk 200 dosis. Ditimbang gel ekstrak kelakai sebanyak 50 mg kemudian ditambah 40 ml larutan DMSO 10%. Sehingga untuk setiap 200 µl larutan mengandung 0,25 mg ekstrak kelakai.

Dosis lazim penggunaan artesunat per hari pada manusia adalah 4 mg/kgbb. Faktor konversi dari manusia dengan BB 70 kg ke mencit dengan BB 20 g adalah sebesar 0,0026. Sehingga untuk mencit digunakan dosis  $4 \text{ mg/kgBB} \times 70 \text{ kgBB manusia} \times 0,0026 = 0,728 \text{ mg/20 g BB mencit}$  atau setara dengan 36,4 mg/kgBB mencit. Satu vial artesunat berisi 60 mg bubuk artesunat. 60 mg bubuk artesunat dicampur dengan 1 ml sodium bikarbonat 5% dan 5 ml larutan glukosa 5%. Hasilnya adalah setiap 1 ml larutan mengandung 10 mg artesunat. Sehingga untuk mencit dengan BB 25 g – 30 g akan mendapat 0,09 ml – 0.1 ml larutan artesunat.

Uji potensi ekstrak kelakai pada infeksi malaria yang dilakukan mengacu pada metode standar Peter's Test (4-Days suppressive test)<sup>15</sup>. Mencit dibagi menjadi 10 kelompok perlakuan dan masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor mencit. Masing-masing kelompok diberi perlakuan sebagai berikut:

**Pb-K-A-:** kontrol negatif / tidak mendapat ekstrak kelakai dan larutan artesunat serta tidak diinfeksi *P.berghei*.

**Pb5K-A-:** tidak mendapat ekstrak kelakai dan larutan artesunat. Diinfeksi *P. berghei* sampai parasitemia mencapai 15-20% kemudian diambil darah.

**Pb3K-A+:** kelompok mencit yang diinfeksi *P.berghei* dan 3 jam kemudian diberi larutan artesunat PO 36,4 mg/kgbb selama 4 hari.

**Pb5K-A+:** kelompok mencit yang diinfeksi *P.berghei* sampai parasitemia 15-20% (+ 5 hari) kemudian diberi larutan artesunat PO 36,4 mg/kgbb selama 4 hari.

**Pb-K10A-:** kelompok mencit yang mendapat ekstrak kelakai PO 10 mg/kgbb selama 4 Hari.

**Pb-K100A-:** kelompok mencit yang mendapat ekstrak kelakai PO 100 mg/kgbb selama 4 Hari.

**Pb3K10A-:** kelompok mencit yang diinfeksi *P.berghei* dan 3 jam kemudian diberi ekstrak kelakai PO 10 mg/kgbb selama 4 hari.

**Pb3K100A-:** kelompok mencit yang diinfeksi *P.berghei* dan 3 jam kemudian diberi ekstrak kelakai PO 100 mg/kgbb selama 4 hari.

**Pb5K10A-:** kelompok mencit yang diinfeksi *P.berghei* sampai parasitemia 15-20% (+ 5 hari) kemudian diberi ekstrak kelakai PO 10 mg/kgbb selama 4 hari.

**Pb5K100A-:** kelompok mencit yang diinfeksi *P.berghei* sampai parasitemia 15-20% (+ 5 hari) kemudian diberi ekstrak kelakai PO 100 mg/kgbb selama 4 hari.

D0 adalah pengamatan hari pertama (setelah infeksi 3 jam dan setelah parasitemia mencapai 15-20%). D1 merupakan pengamatan pada hari ke-2, D2 merupakan pengamatan pada hari ke 3, D3 merupakan pengamatan pada hari ke-4. 24 jam setelah perlakuan terakhir (D4), semua mencit dikorbankan (sacrifice) dengan inhalasi eter. Darah diambil dari jantung untuk pemeriksaan kadar TNF- $\alpha$  dengan ELISA.

Sampel berupa darah mencit yang telah diberi perlakuan diambil dari jantung mencit sebanyak lebih kurang 1 ml, ditampung di dalam tabung dan disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm suhu 40C selama 15 menit untuk mendapatkan plasma.

## Hasil dan Pembahasan

Tabel Rerata kadar TNF- $\alpha$  pada setiap kelompok

Kelompok	Mean TNF- $\alpha$ (pg/ml)	+ SD
Pb-K-A-	7,00	3,71
Pb5K-A-	151,05	53,69
Pb3K-A+	50,17	30,54
Pb5K-A+	165,28	106,64
Pb-K10A-	8,17	2,42
Pb-K100A-	9,72	8,83
Pb3K10A-	196,22	216,32
Pb3K100A-	101,06	29,20
Pb5K10A-	118,94	43,27
Pb5K100A-	192,78	23,08

Uji Kruskal-Wallis didapatkan nilai  $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ) berarti terdapat perbedaan bermakna di antara kelompok perlakuan. Selanjutnya dilakukan uji LSD. Kelompok perlakuan Pb3K-A+, Pb3K10A-, dan Pb3K100A- adalah untuk melihat potensi obat anti malaria (OAM) standar (artesanat) dan ekstrak kelakai terhadap kadar TNF- $\alpha$  pada infeksi awal *P. berghei*. Rerata kadar TNF- $\alpha$  kelompok perlakuan Pb3K-A+ ( $50,17 \pm 30,54$ ) lebih rendah daripada kelompok Pb3K10A- ( $196,22 \pm 216,32$ ) dan Pb3K100A- ( $101,06 \pm 29,20$ ). Rerata kadar TNF- $\alpha$  pada kelompok Pb3K10A lebih tinggi daripada Pb3K-A+, secara uji statistik perbedaan ini bermakna dengan nilai  $p = 0,03$ . Rerata kadar TNF- $\alpha$  pada kelompok Pb3K100A- lebih tinggi daripada Pb3K-A+, namun hasil ini secara uji statistik tidak berbeda bermakna dengan nilai  $p = 0,281$ . Rerata kadar TNF- $\alpha$  kelompok Pb3K10A- lebih tinggi daripada Pb3K100A- yang secara uji statistik berbeda bermakna dengan nilai  $p = 0,047$ . Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kelakai dosis 10 mg/kgbb/hari segera setelah mencit terinfeksi tidak dapat menurunkan kadar TNF- $\alpha$ , sedangkan pemberian ekstrak kelakai dosis 100 mg/kgbb/hari segera setelah mencit terinfeksi dapat menurunkan kadar TNF- $\alpha$ . Hal ini diduga disebabkan jumlah parasitemia yang masih rendah. Potensi ekstrak kelakai terhadap jumlah parasitemia tidak dilakukan pada penelitian ini. Namun bila dibandingkan dengan kadar TNF- $\alpha$  pada kelompok perlakuan

Pb3K10A-, rerata kadar TNF- $\alpha$  kelompok Pb3K100A- lebih rendah dan secara statistik berbeda bermakna.

Kelompok perlakuan Pb5K-A+, Pb5K10A-, dan Pb5K100A- adalah untuk melihat potensi ekstrak kelakai terhadap kadar TNF- $\alpha$  setelah mencit terinfeksi dengan parasitemia yang tinggi. Rerata kadar TNF- $\alpha$  lebih tinggi pada kelompok Pb5K100A- ( $192,78 \pm 23,08$ ) daripada kelompok Pb5K-A+ ( $165,28 \pm 106,64$ ) dan Pb5K10A- ( $118,94 \pm 43,27$ ). Secara uji statistik hasil ini tidak berbeda bermakna antara Pb5K-A-, Pb5K-A+, Pb5K10A-, dan Pb5K100A-. Hasil ini menunjukkan pada penelitian ini pemberian ekstrak kelakai dosis 10 mg/kgbb/hari dan 100 mg/kgbb/hari pada saat parasitemia telah tinggi tidak dapat menurunkan kadar TNF- $\alpha$ . Kandungan zat bioaktif pada tumbuhan kelakai adalah flavonoid, steroid, dan alkaloid. Ekstrak kelakai (*Stenochlaena palustris*) memiliki kandungan total flavonoid yang tinggi dibanding tanaman gerunggang dan pasak bumi yang merupakan tanaman obat di Kalimantan Selatan.

Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f) Bedd) mengandung senyawa flavonoid quercetin. Total flavonoid yang terkandung di dalam ekstrak kelakai adalah 14,5  $\mu\text{g/ml}$ . Flavonoid adalah kelompok senyawa polifenol yang memiliki aktivitas scavenger radikal bebas, penghambat enzim hydrolitic dan oksidatif, serta anti-inflamasi<sup>8</sup>. Flavonoid memiliki aktivitas antimalaria melalui penghambatan terhadap biosintesis asam lemak (FAS-II) parasit dan menghambat influx L-glutamin dan myoinositol kedalam eritrosit terinfeksi.

Respon inflamasi secara signifikan diperantarai oleh faktor transkripsi NF- $\kappa\beta$  dan dihambat oleh I $\kappa\beta$ . Aktivasi seluler diinduksi oleh fosporilasi protein I $\kappa\beta$  (I $\kappa\beta\alpha$  dan I $\kappa\beta\beta$ ). Degradasi protein ini menyebabkan translokasi NF- $\kappa\beta$  ke inti sel yang kemudian berikatan dengan promotor spesifik pada area gen yang mengkode sitokin pro-inflamasi. Efek anti-inflamasi flavonoid quercetin terhadap sitokin proinflamasi TNF- $\alpha$  telah dilakukan. Quercetin memperlihatkan efek anti inflamasi pada sel mononuklear darah tepi / peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) yang diinduksi dengan phorbol myristate acetate (PMA) dan Ca<sup>2+</sup> dengan jalan menghambat

produksi endogen sitokin proinflamasi TNF- $\alpha$ . Efek tersebut diperantarai melalui pengaturan ekspresi gen NF- $\kappa$ B dan I $\kappa$ B. Setelah inkubasi 24 jam dan 48 jam, quercetin secara signifikan menurunkan ekspresi gen NF- $\kappa$ B1 pada konsentrasi 5 sampai 50  $\mu$ M. Pada 72 jam, quercetin secara signifikan menurunkan ekspresi gen NF- $\kappa$ B1 pada konsentrasi 10-50  $\mu$ M.

Kandungan lain ekstrak kelakai adalah senyawa alkaloid. Penelitian tentang efek penghambatan alkaloid pada tanaman herbal terhadap produksi TNF- $\alpha$  dan Nitrit oksida dengan LPS yang diinduksikan pada makrofag telah dilakukan. Penelitian ini menemukan bahwa senyawa alkaloid dapat menekan produksi TNF- $\alpha$  dan NO. Ekspresi TNF $\alpha$  dan iNOS terutama dikontrol oleh faktor transkripsi NF- $\kappa$ B. Pelepasan sinyal dari LPS menyebabkan fosforilasi sebuah protein inhibitor I $\kappa$ B- $\alpha$  yang memblokir NF- $\kappa$ B di sitoplasma. Fosforilasi I $\kappa$ B- $\alpha$  yang cepat menyebabkan pelepasan NF $\kappa$ B ke inti sel dan menyebabkan aktivasi ekspresi gen. Pelepasan sinyal LPS juga menyebabkan ekspresi TNF- $\alpha$  dan iNOS melalui jalur MAP kinase melewati fosforilasi protein kinase seperti p38 MAPK dan JNK. Pada penelitian ini didapatkan alkaloid tidak dapat menghambat keduanya. Alkaloid bekerja dengan mengaktifkan ekspresi faktor transkripsi PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferasi-aktivasi reseptor  $\gamma$ ) untuk menekan TNF- $\alpha$ . Faktor transkripsi ini sangat erat berkaitan dengan NF- $\kappa$ B dan AP-1 (yang merupakan faktor awal mula jalur MAP kinase). Aktivitas antiinflamasi ini tidak bergantung pada aktivitas antioksidan.

Kandungan steroid pada ekstrak kelakai ternyata juga dapat menghambat produksi sitokin pro-inflamasi. Peningkatan gen transkripsi inflamasi diatur oleh faktor transkripsi proinflamasi seperti NF- $\kappa$ B dan aktivator protein-1 (AP1). Steroid dapat menekan inflamasi dengan jalan meningkatkan sintesis protein anti-inflamasi, seperti annexin-1, IL-10, MAPK fosfatase-1 (MKP-1) dan inhibitor NF- $\kappa$ B yaitu I- $\kappa$ B.

## Penutup

Ekstrak kelakai dosis 100 mg/kgbb/hari yang diberikan segera setelah mencit BALB/c terinfeksi P. berghei ANKA pada penelitian ini dapat menurunkan kadar TNF- $\alpha$ .





## Daftar Pustaka

- [1] M. Almurdati, A. Zamri, T. T. Nugroho *et al.*, “Antioxidant and antidiabetic activities of mempening (*lithocarpus bancanus*) leaves,” *Pharmacognosy Journal*, vol. 12, no. 2, pp. 328–334, 2020.
- [2] H. Cao, T.-T. Chai, X. Wang *et al.*, “Phytochemicals from fern species: potential for medicine applications,” *Phytochemistry Reviews*, vol. 16, no. 3, pp. 379–440, 2017.
- [3] H. Liu, J. Orjala, O. Sticher, and T. Rali, “Acylated flavonol glycosides from leaves of *Stenochlaena palustris*,” *Journal of Natural Products*, vol. 62, no. 1, pp. 70–75, 1999.
- [4] N. Sofyanti, D. Iriani, D. Fitmawati, and A. A. Roza, “*Stenochlaena riauensis* (Blechnaceae), a new fern species from Riau, Indonesia,” *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy*, vol. 22, no. 2, pp. 137–141, 2015.
- [5] S. Arullappan, S. Sawai, L. A. Chee, M. Mahandan, and R. Shanmugavelan, “Phytochemical screening and evaluation of cytotoxic effect and antioxidant activity of fractions isolated from *Stenochlaena palustris* (Burm.f.) Bedd. Leaves,” *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, vol. 51, no. 4s, pp. s735–s740, 2017.
- [6] A. Benjamin and V. Manickam, “Medicinal pteridophytes from the western Ghats,” *Indian Journal of Traditional Knowledge*, vol. 6, no. 4, pp. 611–618, 2007.
- [7] T.-T. Chai, E. Panirchellvum, H.-C. Ong, and F.-C. Wong, “Phenolic contents and antioxidant properties of *Stenochlaena palustris*, an edible medicinal fern,” *Botanical Studies*, vol. 53, no. 4, pp. 439–446, 2012.

- [8] Z. Zuraini, S. Sasidharan, S. R. Kaur, and M. Nithiyayini, "Antimicrobial and antifungal activities of local edible fern *Stenochlaena palustris*," (Burm. F.) Bedd. Pharmacology online, vol. 1, pp. 233–237, 2010.
- [9] G. Novita, S. Kusmardiyani, and I. Fidrianny, "Antioxidant activities from various extracts of diferent parts of kelakai (*Stenochlaena palustris*) grown in central Kalimantan-Indonesia," Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, vol. 9, no. Suppl 2, pp. 215–219, 2016.
- [10] T.-T. Chai, M.-T. Kwek, H.-C. Ong, and F.-C. Wong, "Water fraction of edible medicinal fern *Stenochlaena palustris* is a potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitor with concurrent antioxidant activity," Food Chemistry, vol. 186, pp. 26–31, 2015.
- [11] V. Sumathy, S. Jothy Lachumy, Z. Zuraini, and S. Sasidharan, "Effects of *Stenochlaena palustris* leaf extract on growth and morphogenesis of food borne pathogen, *Aspergillus Niger*," Malaysian journal of nutrition, vol. 16, no. 3, pp. 439–446, 2010.
- [12] N. J.-Y. Chear, K.-Y. Khaw, V. Murugaiyah, and C.-S. Lai, "Cholinesterase inhibitory activity and chemical constituents of *Stenochlaena palustris* fronds at two diferent stages of maturity," Journal of Food and Drug Analysis, vol. 24, no. 2, pp. 358–366, 2016.
- [13] H. Liu, J. Orjala, T. Rali, and O. Sticher, "Glycosides from *Stenochlaena palustris*," Phytochemistry, vol. 49, no. 8, pp. 2403–2408, 1998.
- [14] N. J.-Y. Chear, A. N. Fauzi, K.-Y. Khaw, S.-B. Choi, N. S. Yaacob, and C.-S. Lai, "Free radical scavenging and cytotoxic properties of acylated and non-acylated kaempferol glycosides from *Stenochlaena palustris*: a perspective on their structure-activity relationships," Pharmaceutical Chemistry Journal, vol. 53, no. 3, pp. 188–193, 2019.
- [15] R. Scherer and H. T. Godoy, "Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method," Food Chemistry, vol. 112, no. 3, pp. 654–658, 2009.
- [16] R. Hendra, R. Khodijah, R. Putri *et al.*, "Cytotoxicity and antiplasmodial properties of diferent *Hylocereus polyrhizus* peel extracts," Medical Science Monitor Basic Research, vol. 27, 2021.
- [17] R. Hendra, S. N. Gurning, U. P. A. Panjaitan, and H. Y. Teruna, "Antioxidant activity of an epiphyte fern in palm oil tree," Journal of Physics Conference Series, vol. 1655, 2020.

- (2015) Info Datin Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI. Situasi penyakit kanker. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI. 2.
- (2018) Dojindo Molecular Technologies. Measuring cell viability/ cytotoxicity. Washington DC: Dojindo Molecular Technologies.
- (2018) International Agency for Research on Cancer. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. World Health Organization. 3.
- (2019) American Cancer Society. Treating oral cavity and oropharyngeal cancer. New York: American Cancer Society
- Adcock, IM and SJ Lane, 2003. Mechanism of Steroid Action and Resistance in Inflammation. Corticosteroid-insensitive asthma: molecular mechanisms. *Journal of Endocrinology* (2003) 178, 347–355
- Adenan, and Suhartono E. 2010. *Stenochlaena palustris* aqueous extract reduces hepatic peroxidative stress in *Marmota calligata* with induce fever. *Universa Medicina*, vol.29, no.3.
- Adenan dan Suhartono. 2010. *Stenochlaena palustris* Aqueous Extract Reduces Hepatic Peroxidative Stress in *Marmota caligata* with Induced Fever. *University Medicina* 29.
- Adeputri E, Rustikawati, Suryati D, Herison C. 2016. Penapisan tiga puluh tujuh genotif tomat dan seleksi primer RAPD untuk toleransi terhadap layu bakteri (*Ralstonia solanacearum*). *Akta agrosia*. 19(1): 28-42.
- Ahmed OM, Mohamed T, Moustafa H, Hamdy H, Ahmed RR, About E. Quercetin and low level laser therapy promote wound healing process in diabetic rats via structural reorganization and modulatory effects on inflammation and oxidative stress. *Biomed Pharmacother*. 2018; 101: 58–73.
- Ajizah A. 2004. Sensitivitas *Salmonella fhyphimurium* terhadap ekstrak daun *Psidium guajava* L. *Bioscientiae*. 1(1): 31-38.
- Akao Y, Nakagawa Y, limuna M, Nozawa Y. Anti cancer effects of Xanthones from pericarps of mangosteen. *Int J Molec sci* 2008;9: 355-70.
- Alberts B, Alexander J, Julian L. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science. 2002.
- Ali T, Grote P. Beyond the RNA-dependent function of LncRNA genes. *Elife*. 2020;9:e60583. doi: 10.7554/eLife.60583
- Almeida TC, Silva GN da, Souza DV de, Malinverni AC de M, Aguiar O, Estadella D, *et al*. Resveratrol effects in oral cancer cells: a comprehensive review. *Medical Oncology*. 2021 Jul; 38(8): 97.

- Alsawaf S, Alnuaimi F, Afzal S, Thomas RM, Chelakkot AL, Ramadan WS, Hodeify R, Matar R, Merheb M, Siddiqui SS, Vazhappilly CG. Plant flavonoids on oxidative stress-mediated kidney inflammation. *Biology (Basel)*. 2022; 11(12): 1717.
- Amini A. Early stage oral tongue cancer with an ipsilateral nodal recurrence 2 years later: what do you treat? *Int J Radiat Oncol*. 2020;106(5):900-1. doi: 10.1016/j.ijrobp.2018.12.035
- Andari D, Khan FI, Jakfar SI. Methanol extract of katuk (*Sauropus androgynus*) leaves as an anti-inflammatory agent: Animal study in carrageenan-induced rat models of inflammation. *Mol Cell Biomed Sci*. 2022; 6(3): 129-34.
- Andita PD, Rosana A, Perdana A, Ameilinda M, Ilham AF, Adam H, Edy M. Aktivitas sitotoksitas ekstrak etanolik herba ciplukan (*Physalis angulata* L) terhadap kanker rahim HeLa melalui modulasi ekspresi protein p53. *Jurnal Statistika*. 2010; 2: 2.
- Anggelika, Suprihadi, Pujiyanto. 2014. Uji aktifitas antibakteri ekstrak tumbuhan *Euphorbia thirta* L. terhadap *Ralstonia solanacearum*, *Escherichia coli*, dan *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. *Biologi*. 3(2): 49-58.
- Anggraeni, D.S., dan Erwin. 2015. “Uji Fitokimia dan Uji Toksisitas (Brine Shrimp Lethality Test) Ekstrak Daun Kelakai (*Stenochlaena palustris*)”. *Prosiding Seminar Tugas Akhir*. Hal: 71-75.
- Anggraeni D, Erwin. 2006. Uji fitokimia dan uji ekstrak daun kelakai (*Stenochlaena palustris*). Di dalam: *Prosiding Seminar Tugas Akhir Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam 2015*. Universitas Mulawarman, Samarinda, Juni 2015.
- Anjum, S.I.; Ullah, A.; Khan, K.A.; Attaullah, M.; Khan, H.; Ali, H.; Bashir, M.A.; Tahir, M.; Rana, R.M.; Ghramh, H.A.; *et al*. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi J. Boil. Sci*. 2019, 26, 1695–1703. [CrossRef] [PubMed]
- Anwar R, Setiawan A, Supriatno, Supratman U. Senyawa daun rasamala (*Altingia excelsa* Nornha) sebagai penghambat proliferasi sel kanker lidah manusia *in vitro*. *STOMATOGNATIC–Jurnal Kedokteran Gigi*. 2019 Okt; 16(2): 42–48.
- Apriyanto DR, Hartati S, Dewi BE, AokiUtsubo C, Hotta H (2018) Aktivitas sitotoksitas ekstrak metanol daun sirsak (*Annona muricata* L.)

- terhadap karsinoma hepatoseluler strain Huh7it-1 cell line. *Tunas Med J Kedokteran dan Kesehatan* 4: 1–4
- Ardiaria M. Disfungsi mitokondria dan stress oksidatif. *JNH (Journal Nutr Heal.* 2019; 7(3): 50–5.
- Ariesanti Y, Sandra F, Claresta B & Alvita L, *Coffea canephora* bean extract induces NIH3T3 cell migration. *Indones Biomed J*, 13 (2021) 216.
- Ariesanti Y, Sandra F, Claresta B & Alvita L, *Coffea canephora* bean extract induces NIH3T3 cell migration. *Indones Biomed J*, 13 (2021) 216.
- Arini DID, Kinho J. 2012. Keragaman jenis tumbuhan paku (Pteridophyta) di Cagar Alam Gunung Ambang Sulawesi Utara. *Balai Penelitian Kehutanan Manado.* 2(1): 17-39.
- Arullappan S, Sawai S, Chee LA, Mahandan M, Shanmugavelan R (2017) Phytochemical screening and evaluation of cytotoxic effect and antioxidant activity of fractions isolated from *Stenochlaena palustri* (Burm.f.) Bedd. leaves. *Indian J Pharm Educ Res* 51: s735–s740. doi: 10.5530/ijper.51.4s.106
- Arundina I, Tiantiana, Diyatri I, Surboyo MDC, Adityasari R. Acute toxicity test of liquid smoke of rice hull (*Oryza sativa*) on mice (*Mus Musculus*). *J Int Dent Med Res.* 2020; 13(1): 91–6.
- Asgharpour, F.; Moghadamnia, A.A.; Zabihi, E.; Kazemi, S.; Namvar, A.E.; Gholinia, H.; Motalebnejad, M.; Nouri, H.R. Iranian propolis efficiently inhibits growth of oral streptococci and cancer cell lines. *BMC Complement. Altern. Med.* 2019, 19, 266–268. [CrossRef]
- ASTM. 1985. Standard Classification of Peat Samples by Laboratory Testing (D4427-84). ASTM, Section 4, Volume 04.08 Soil and Rock:883-884 Available from: <http://www.biotech.uiuc.edu>.
- Awang-Kanak F, Abu Bakar MF. Traditional vegetable salad (ulam) of Borneo as source of functional food. *Food Res.* 2019; 4(1): 1–12.
- Azizah, D.N., Endang, K., dan Fahrauk, F. 2014. “Penetapan Kadar Flavonoid Metode AlCl<sub>3</sub> Pada Ekstrak Metanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) Vol. 2 (2): 45-49.
- Aziz ZAA, Ali SAM, Ahmad A, Mohd Setapar SH (2016) Application of herbal extract and its medicinal value. *Der Pharm Lett* 8(9): 161-167.
- Badan Pengawas Obat Dan Makanan Republik Indonesia. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat Dan Makanan Republik Indonesia Nomor 7 Tahun 2014 Tentang Pedoman Uji Toksisitas Nonklinis Secara *in*

- vivo*. 2014. p. 3–4. Available from: <https://peraturanpedia.id/peraturan-badan-pengawas-obat-dan-makanan-nomor-7-tahun-2014/>.
- Bai H, Yang J, Meng S, Liu C. Oral microbiota driven cell migration in carcinogenesis and metastasis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Apr; 12: 864479.
- Biotechnology center. Apoptosis quantitative analysis techniques. [cited 2010 Nov 10].
- Biswas KH. Molecular mobility-mediated regulation of e-cadherin adhesion. *Trends Biochem Sci*. 2020;45(2):163-73. doi: 10.1016/j.tibs.2019.10.012
- Borawska, M.; Naliwajko, S.; Moskwa, J.; Markiewicz-Zukowska, R.; Puścion-Jakubik, A.; Soroczyńska, J. Anti-proliferative and anti-migration effects of Polish propolis combined with *Hypericum perforatum* L. on glioblastoma multiforme cell line U87MG. *BMC Complement. Altern. Med*. 2016, 16, 367. [CrossRef] [PubMed]
- Budi HS, Kriswandini IL, Iswara AD. Antioxidant activity test on ambonese banana stem sap (*Musa parasidiaca* var. *sapientum*). *Dent J*. 2015; 48(4): 188–92.
- Bueno-Silva, B.; Rosalen, P.L.; Alencar, S.M.; Mayer, M.P.A. Anti-inflammatory mechanisms of neovestitol from Brazilian red propolis in LPS-activated macrophages. *J. Funct. Foods* 2017, 36, 440–447. [CrossRef]
- Cahyono B, Huda MDK, Limantara L. 2011. Pengaruh proses pengeringan rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb) terhadap kandungan dan komposisi kurkuminoid. *Reaktor*. 13(3): 165-171.
- Callixte C, Baptiste NJ, Arwati H. Phytochemical screening and antimicrobial activities of methanolic and aqueous leaf extracts of *Carica papaya* grown in Rwanda. *Mol Cell Biomed Sci*. 2020; 4(1): 39-44.
- Carballo GB, Honorato JR, de Lopes GPF & Spohr TCLSE, A highlight on Sonic hedgehog pathway. *Cell Commun Signal*, 16 (2018) 11.
- Carballo GB, Honorato JR, de Lopes GPF & Spohr TCLSE, A highlight on Sonic hedgehog pathway. *Cell Commun Signal*, 16 (2018) 11.
- Cardenas V, Mace D, Richardson, Wilson DF, Shan S, Dewhirst MW. The pervasive presence of uctuating oxygenation in tumors. *Cancer Res*. 2008; 68: 5812.
- Carneiro BA, El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020 Jul; 17(7): 395–417.

- Carvalho, R.; Baltazar, F.; Aguiar, C.A.A. Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* 2015, 2015, 1–29. [CrossRef] [PubMed]
- Castañeda AM, Meléndez CM, Uribe D, Pedroza-Díaz J. Synergistic effects of natural compounds and conventional chemotherapeutic agents: recent insights for the development of cancer treatment strategies. *Heliyon.* 2022; 8(6): e09519. doi: 10.1016/j.heliyon.2022. e09519.
- CCRC (2009a) Prosedur Imunositokimia, Cancer Chemoprevention Research Center Farmasi UGM Yogyakarta, 1–7
- CCRC (2009b) Prosedur tetap uji sitotoksik metode MTT, Cancer Chemoprevention Research Center Farmasi UGM Yogyakarta, 6–9
- Chai, Tsun-Thai., Panirchellvum, E., Ong, Hean-Chooi and Wong, Fai-Chu. 2012. Phenolic contents and antioxidant properties of *Stenochlaena palustris*, an edible medicinal fern, *Botanical Studies*.
- Chai TT, Kwek MT, Ong HC, Wong FC (2015) Water fraction of edible medicinal fern *Stenochlaena palustris* is a potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitor with concurrent antioxidant activity. *Food Chem* 186: 26– 31. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.12.099
- Chamoli A, Gosavi AS, Shirwadkar UP, Wangdale K V., Behera SK, Kurrey NK, *et al.* Overview of oral cavity squamous cell carcinoma: risk factors, mechanisms, and diagnostics. *Oral Oncol.* 2021 Okt; 121: 105451.
- Chan, G.C.; Cheung, K.-W.; Sze, D.M.-Y. The Immunomodulatory and Anticancer Properties of Propolis. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2012, 44, 262–273. [CrossRef]
- Chan CK, Supriady H, Goh BH, Kadir HA. Elephantopus scaber induces apoptosis through ROS-dependent mitochondrial signaling pathway in HCT116 human colorectal carcinoma cells. *J Ethnopharmacol.* 2015; 168: 291-304.
- Chang, C, Ming, H., Hwei, M., and Chern J. 2002. “Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods.” *Journal of Food and Drug Analysis.* Vol. 10 (3): 1181.
- Chang TL, Ding HY, Kao YW. Role of Ginsenoside Rd in Inhibiting 26S proteasome activity. *J Agr Food Chem.* 2008;56(24):12011-5. doi: 10.1021/jf801427e
- Chang WL, Cheng FC, Wang SP, Chou ST & Shih Y, Cinnamomum cassia essential oil and its major constituent cinnamaldehyde induced cell cycle

- arrest and apoptosis in human oral squamous cell carcinoma HSC-3 cells. *Environ Toxicol*, 32 (2017) 456.
- Chang WL, Cheng FC, Wang SP, Chou ST & Shih Y, Cinnamomum cassia essential oil and its major constituent cinnamaldehyde induced cell cycle arrest and apoptosis in human oral squamous cell carcinoma HSC-3 cells. *Environ Toxicol*, 32 (2017) 456.
- Chaverri JP, Rodriguez NC, Ibarra MO, Jasmin M, Rojas P. Medicinal properties of Mangosteen (*Gracinia mangostana*). Mexico: Elsevier; 2008.
- Chear NJ-Y, Khaw K-Y, Murugaiyah V, Lai C-S. Cholinesterase inhibitory activity and chemical constituents of *Stenochlaena palustris* fronds at two different stages of maturity. *J Food Drug Anal*. 2016; 24(2): 358–66.
- Chear NJY, Fauzi AN, Khaw KY, Choi SB, Yaacob NS, Lai CS (2019) Free radical scavenging and cytotoxic properties of acylated and non-acylated kaempferol glycosides from *Stenochlaena palustris*: A perspective on their structure – activity relationships. *Pharm Chem J* 53: 188– 193. doi: 10.1007/s11094-019-01977-2
- Chear NJY, Fauzi AN, Khaw KY, Choi SB, Yaacob NS, Lai CS. Free radical scavenging and cytotoxic properties of acylated and non-acylated kaempferol glycosides from *stenochlaena palustris*: a perspective on their structure activity relationships. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019 Jun; 53(3): 188–93.
- Chear NJY, Khaw K, Murugaiyah V, Lai CS (2016) Cholinesterase inhibitory activity and chemical constituents of *Stenochlaena palustris* fronds at two different stages of maturity. *J Food Drug Anal* 24: 358–366. doi: 10.1016/j.jfda.2015.12.005
- Chen LG, Yang L, Wang C. antiinflammatory activity of mangostins from *Garcinia mangostana*. *Food and Chemical Toxicology* 2007
- Chen S, Bu D, Ma Y, Zhu J, Chen G, Sun L, *et al*. H19 overexpression induces resistance to 1,25(OH)2D3 by Targeting VDR through miR-675- 5p in colon cancer cells. *neoplasia*. 2017;19(3):226-36. doi: 10.1016/j.neo.2016.10.007
- Chen YK, Huang HC, Lin LM & Lin CC, Primary oral squamous cell carcinoma: An analysis of 703 cases in southern Taiwan. *Oral Oncol*, 35 (1999) 173.

- Chen YK, Huang HC, Lin LM & Lin CC, Primary oral squamous cell carcinoma: An analysis of 703 cases in southern Taiwan. *Oral Oncol*, 35 (1999) 173.
- Chen Z, Huang H, Wang C, Li Y, Ding J, Sankawa U, Noguchi H & Iitaka Y, Hongconin, a new naphthalene derivative from hong-cong, the rhizome of *Eleutherine Americana* Merr. et Heyne (Iridaceae). *Chem Pharm Bull*, 34 (1986) 2743.
- Chen Z, Huang H, Wang C, Li Y, Ding J, Sankawa U, Noguchi H & Iitaka Y, Hongconin, a new naphthalene derivative from hong-cong, the rhizome of *Eleutherine Americana* Merr. et Heyne (Iridaceae). *Chem Pharm Bull*, 34 (1986) 2743.
- Chin YW, Kinghorn AD. Structural characterization, biological effects, and synthetic studies on Xanthones from Mangosteen (*Garcinia mangostana*), a popular botanical dietary supplement. USA: The Ohio State University; 2008.
- Chira S, Gulei D, Hajitou A, Zimta AA, Cordelier P, Berindan-Neagoe I. CRISPR/Cas9: transcending the reality of genome editing. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2017;7:211-22. doi: 10.1016/j.omtn.2017.04.001
- Cicuzza D. Ethnobotany of the mountain regions of southeast asia. Switzerland: Springer Cham; 2021. p. 1021–1026.
- CLSI M02-A11., 2012, “Update Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing Advance for Medical Laboratory Standards Institute”, Vol. 32 No.2, Yonsei University, p. 12, 13, 18, 19, 521982.
- Czyżewska, U.; Siemionow, K.; Zaręba, I.; Milyk, W. Proapoptotic Activity of Propolis and Their Components on Human Tongue Squamous Cell Carcinoma Cell Line (CAL-27). *PLOS ONE* 2016, 11, e0157091. [CrossRef]
- Darma AP, Ashari RA, Nugroho PA, Monikawati A, Fauzi IA, Hermawan A, Meiyanto E (2011) Aktivitas sitotoksik ekstrak etanolik herba ciplukan (*Physalis angulata* L.) pada sel kanker leher rahim HeLa melalui modulasi ekspresi protein p53. *Farmasains* 1: 28–35. doi: 10.22219/far.v1i2.1163
- Debnath SL, Kundu P, Ahad MF, Saha L, Biswas NN, Sadhu SK. Investigation of phytochemical and pharmacological assessment of ethanol extract of *Stenochlaena palustris*- an edible fern of Sundarbans. *J Med Plants Stud*. 2021; 9(3): 226–32.

- Depkes RI, 2000, "Parameter Standar Umum Pembuatan Ekstrak Tumbuhan Obat", Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, Hlm. 14-17.
- Depkes RI. 2009. Farmakope Herbal Indonesia. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, Hlm. 169-172.
- Desen W. Buku ajar onkologi klinis. Jakarta: Balai Penerbit FKUI; 2008.
- Dewa, R.P., dan Mozes, S.Y.R. 2014. "Pengaruh Perendaman KOH 5% Terhadap Rumput Laut Sebagai Bahan Baku Produk Gel Pengharum Ruang". Biopropal Industri. Vol. 5 (2): 53-60.
- Dewi, I.D.A.D.Y., Astuti, K., dan Wardani, N.K. 2013. "Identifikasi Kandungan Kimia Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Gracinia mangostana* L.)". Jurnal Farmasi Udayana. Vol. 2 (4): 13-18.
- Dia SPS, Nurjanah, Jacoeb AM. 2015. Komposisi kimia dan aktivitas antioksidan akar, kulit batang dan daun lindur. Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia. 18(2): 205-219.
- Dirjen POM Depkes RI. 1989. *Materia Medika Indonesia*. Jilid V. Departemen Kesehatan RI. Jakarta. Hlm. 536- 553.
- DK. Kanker rongga mulut, awalnya seperti sariawan. Jakarta: PDGI Online; 2008.
- Dohude GA, Audria C. Tingkat pengetahuan mahasiswa kedokteran gigi tentang faktor risiko karsinoma sel skuamosa rongga mulut. *Jurnal Kedokteran Gigi Univ Padjadjaran*. 2022 Agu; 34(2): 93-9.
- Dominiak, M.; Saczko, J. Method of Primary Culture of Human Fibroblasts for Autologous Augmentation. Patent No. PL209784B1, 31 October 2011.
- Ellis IR, The migration and invasion of oral squamous carcinoma cells: Matrix, growth factor and signalling involvement. *Cancers*, 13 (2021) 2633.
- Ellis IR, The migration and invasion of oral squamous carcinoma cells: Matrix, growth factor and signalling involvement. *Cancers*, 13 (2021) 2633.
- Elya B. Manfaat kulit manggis: antikanker & antioksidan kuat. Jakarta: Departemen Farmasi Universitas Indonesia; 2009.
- Eziefule OM, Arozal W, Wanandi SI, Louisa M, Wuyung PE, Dewi S, *et al*. *Andrographis paniculata* ethanolic extract improved doxorubicin-induced cardiac inflammation, alterations in liver function parameters and anemia. *Mol Cell Biomed Sci*. 2024; 8(2): 117-26.

- Fahrni, Handayani R, Novaryatiin S. Potensi tumbuhan kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F.) Bedd.) asal kalimantan tengah sebagai afrodisiaka. *Jurnal Surya Medika*. 2018; 3(2): 144–53.
- Fajriani N, Carabelly AN, Apriasari ML. The effect of toman fish extract (*Channa Micropeltes*) on neutrophil diabetes mellitus wound healing. *In vivo* study in the back of male Wistar mice (*Ratus Novergicus*). *Dentino J Kedokt Gigi*. 2018; 3(1): 15–21.
- Fang Y, Fullwood MJ. Roles, functions, and mechanisms of long non-coding RNAs in cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2016;14(1):42–54. doi: 10.1016/j.gpb.2015.09.006
- Fan HX, Wang S, Zhao H, Liu N, Chen D, Sun M & Zheng JH, Sonic hedgehog signaling may promote invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma by activating MMP-9 and E-cadherin expression. *Med Oncol*, 31 (2014) 41.
- Fan HX, Wang S, Zhao H, Liu N, Chen D, Sun M & Zheng JH, Sonic hedgehog signaling may promote invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma by activating MMP-9 and E-cadherin expression. *Med Oncol*, 31 (2014) 41.
- Fatmawati D, Suparmi S, Yusuf I, Israhnanto I (2018) Selektivitas antikanker ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*) pada lini sel kanker payudara. *J Bio-Site* 4: 21– 40. doi: 10.22437/bs.v4i2.5440
- Febrina L, Rusli R, Mutlihah F. 2015. Optimalisasi ekstrak antioksidan uji metabolit sekunder tumbuhan libo (*Ficus variegata* Blume). *Tropical pharmacy and chemistry*. 3(2):74-81.
- Fidock, David A *et al*. *Antimalarial Drug Discovery: Efficacy Model for Compound Screening* (Supplementary Document).
- Firdaus IWAK, Dewi N, Fuady RI, Apriasari ML. Antibacterial effect of kelakai leaf extract (*Stenochlaena palustris* (Burm) Bedd.) for inhibiting *Enterococcus faecalis*. *ODONTO Dent J*. 2022; 9(1): 110–8.
- Firmansyah SB. 2015. Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Ekstrak Metanol Rumput Laut (*Sargassum duplicatum* J. Agardh) serta Potensinya sebagai Alternatif Pengawet Alami pada Telur Asin. [Skripsi]. Semarang (ID): Universitas Islam Negeri Walisongo,
- Forbes AM, Lin H, Meadows GG, Meier GP (2014) Synthesis and anticancer activity of new flavonoid analogs and inconsistencies in assays related to proliferation and viability measurements. *Int J Oncol* 45(2): 831-842.

- Foster JR. Cell death and cell proliferation in the control of normal and neoplastic tissue growth. *Toxicologic Pathol* 2000;28(3):441-6.
- Gewies A. Introduction to apoptosis, 2003. p. 1-26. [cited 2010 Nov 10]. Available from: <http://www.celldeath.de/encyclo/apover/apover.htm>.
- Giannopoulou, E.; De Castro, S.L.; Marcucci, M.C. Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 2000, 31, 3–15. [CrossRef]
- Gimenez-Bonafe P, Tortosa A, Perez-Tomas R (2009) Overcoming drug resistance by enhancing apoptosis of tumor cells. *Curr Cancer Drug Targets* 9: 320–340. doi: 10.2174/156800909788166600
- Girsang E, Lister INE, Ginting CN, Khu A, Samin B, Widowati W, *et al.* Chemical constituents of snake fruit (*Salacca zalacca* (Gaert.) Voss) peel and in silico anti-aging analysis. *Mol Cell Biomed Sci.* 2019; 3(2): 122-8.
- Grecka, K.; Ku 's, P.M.; Oki 'nczyc, P.; Worobo, R.; Walkusz, J.; Szweda, P. The Anti-Staphylococcal Potential of Ethanolic Polish Propolis Extracts. *Molecules* 2019, 24, 1732. [CrossRef]
- Greenwell M, Rahman PKSM (2015) Medicinal plants: their use in anticancer treatment. *Int J Pharm Sci Res* 6(10): 4103-4112.
- Hafid, Achmad Fuad *et al.* 2011. Model Terapi Kombinasi Ekstrak Etanol 80% Kulit Batang Cempedak (*Artocarpus Champeden Spreng.*) dan Artesunat pad Mencit Terinfeksi Parasit Malaria. *J. Indon Med Assoc*, volum: 61, No.4 April.
- Haifa R, Sartika CR, Faried A, Hadisaputri YE, Chouw A, Wijaya A, *et al.* Potency of peripheral blood-and umbilical cord blood-derived dendritic cells and their secretomes as vaccines for cancer. *Mol Cell Biomed Sci.* 2024; 8(1): 31-6.
- Hanani, E., A. mun'im, & R. Sekarin. 2005. Identifikasi Senyawa Antioksidan dalam Spons *Callyspongia* Sp dari Kepulauan Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian.* 2: 127 – 133.
- Hancock SB, Krempl GA, Canfield V, Bogardus C, Kojouri K, Kaneaster SK, *et al.* Treatment of base of tongue cancer with paclitaxel, ifosfamide, and cisplatinum induction chemotherapy followed by chemoradiotherapy. *Laryngoscope.* 2008;118(8):1357-61. doi: 10.1097/MLG.0b013e318175336a
- Harijanto, P.N. *et al.* 2010. *Malaria dari Molekuler ke Klinis.* Edisi 2. EGC: Jakarta.

- Harun A, Satari, Oewen, Supriatno. Aktivitas antitumor agen celecoxib terhadap invasi sel kanker lidah SP-C1 (kajian *in vitro*). *Padjajaran J. Dent.* 2011; 23(1): 1 – 5.
- Hassan SHA, Bakar MFA (2013) Antioxidative and anticholinesterase activity of cyphomandra betacea fruit. *Sci World J* p. 1-7.
- Herbarium Bandungense. 2015. *Stenochlaena palustris* (Burm.F) Bedd. Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati. Bandung.
- Heriyati, Khotimah S, Wardoyo ERP. 2016. Aktivitas antibakteri fraksi diklorometan dan N-Heksana paku sisik (*Drymoglossum piloselloides* L. presl.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi*. *Protobiont.* 5(3): 82-88.
- Hiradeve SM, Rangari VD. A review on pharmacology and toxicology of *Elephantopus scaber* Linn. *Nat Prod Res.* 2014; 28(11): 819-30.
- Hiradeve SM, Rangari VD. *Elephantopus scaber* Linn.: A review on its ethnomedical, phytochemical and pharmacological profile. *J Appl Biomed.* 2014; 12(2): 49-61.
- Hjazi A, Alissa M, Alqasem AA, Alghamdi A, Alghamdi SA. Cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, triggers apoptotic cell death in triple negative breast cancer cells. *Mol Biol Rep.* 2024; 51(1): 856. doi: 10.1007/s11033-024-09723-y. PMID: 39066893.
- Ho, R., T. Teai, J.-P. Bianchini, R. Lafont, and P. Raharivelomanana. 2010. Ferns: From traditional uses to pharmaceutical development, chemical identification of active principles. p. 321-346. In H. Fernández, M.A. Revilla, and A. Kumar (ed.). *Working with ferns: Issues and applications.* Springer, New York.
- Houghton, P.; Fang, R.; Techatanawat, I.; Steventon, G.; Hylands, P.J.; Lee, C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods* 2007, 42, 377–387. [CrossRef] [PubMed]
- Howard A, Agrawal N, Gooi Z. Lip and oral cavity squamous cell carcinoma. *Hematol Oncol Clin N Am.* 2021 Okt; 35(5): 895–911.
- Ho WY, Liew SS, Yeap SK, Alitheen, NB. Synergistic cytotoxicity between *Elephantopus scaber* and tamoxifen on MCF-7-derived multicellular tumor spheroid. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2021; 2021: 6355236. doi: 10.1155/2021/6355236.

- Ho WY, Yeap SK, Ho CL, Raha AR, Suraini AA, Alitheen NB. Elephantopus scaber induces cytotoxicity in MCF-7 human breast cancer cells via p53-induced apoptosis. *J Med Plants Res.* 2011; 5(24): 5741-9.
- Hsu BY, Lu TJ, Chen CH, Wang SJ, Hwang LS. Biotransformation of ginsenoside Rd in the ginseng extraction residue by fermentation with lingzhi (*Ganoderma lucidum*). *Food Chem.* 2013;141(4):4186-93. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.06.134
- [Http://penahijau.org](http://penahijau.org). Ratusan Desa Di Kalsel Rawan Malaria. Diunduh pada tanggal 1 januari 2016.
- Hu F, Pan D, Zheng W, Yan T, He X, Ren F, et al. Elucidating respective functions of two domains BIR and C-helix of human IAP survivin for precise targeted regulating mitotic cycle, apoptosis and autophagy of cancer cells. *Oncotarget.* 2017; 8(69): 113687-700.
- Husna FA, Sulasmi ES, Witjoro A. 2015. Uji Aktifitas Antibakteri Ekstrak Metanol Ental Muda (*Diplazium esculentum* Retz.) Swartz terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* secara *in vitro*. [Skripsi]. Malang (ID): Universitas Negeri Malang. Ibrahim
- Hussein AA, Forouzanfar T, Bloemena E, Visscher JG, Brakenhoff RH, Leemans CR, et al. A review of the most promising biomarkers for early diagnosis and prognosis prediction of tongue squamous cell carcinoma. *Brit J Cancer.* 2018;119(6):724-36. doi: 10.1038/s41416-018-0233-4
- Ieyama T, Gunawan-Puteri MDPT & Kawabata J,  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors from the bulb of *Eleutherine americana*. *Food Chem*, 128 (2011) 308.
- Ieyama T, Gunawan-Puteri MDPT & Kawabata J,  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors from the bulb of *Eleutherine americana*. *Food Chem*, 128 (2011) 308.
- Indrayani, S. 2008. "Validasi Penetapan Kadar Kuersetin Dalam Sediaan Krim Secara Kolorimetri dengan Pereaksi  $AlCl_3$ ". Skripsi. Yogyakarta: Universitas Sanata Dharma. Hal: 7,8,25.
- Insanu M, Kusmardiyani S & Hartati R, Recent studies on phytochemicals and pharmacological effects of *Eleutherine americana* Merr. *Procedia Chem*, 13 (2014) 221.
- Insanu M, Kusmardiyani S & Hartati R, Recent studies on phytochemicals and pharmacological effects of *Eleutherine americana* Merr. *Procedia Chem*, 13 (2014) 221.
- Irsyad M. 2013. Standarisasi Ekstrak Etanol Tanaman Ketumpangan Air (*Peperomia pellucida* L. Kunth). [Skripsi]. Jakarta (ID): UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.

- Istiqomah A, Muti'ah R, Hayati EK (2015) Anticancer activity against breast cancer cells T47D and identification of its compound from extracts and fractions of leaves bamboo grass (*Lophaterum gracile* B.). *Alchemy* 4: 6–16. doi: 10.18860/al.v4i1.3138
- Jamshidi, M., E. Shabani, Z. Hashemi, dan M.A. Ebrahimzadeh. 2014. Evaluation of Three Method for The Extraction of Antioxidant from Leaf and Aerial Parts of *Lythrum salicaria* L. (Lythraceae). *International Food Research Journal*. 2: 783-788
- Jawetz, Ernest, Melnick EAA. 1995. *Mikrobiologi untuk Profesi Kesehatan*. Bonang, Jakarta.
- Jeane M, Asih IARA, Bogoriani NW. Asupan glikosida flavonoid terong belanda (*Solanum betaceum* Cav.) terhadap aktivitas superoksida dismutase dan kadar malondialdehid tikus Wistar yang diberi aktivitas fisik maksimal. *J Media Sains*. 2018; 2(1): 32–6.
- Johnson DE, Burtness B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2020 Nov; 6(1): 92.
- Jun, M. H. Y., J.Y. Yu, C. X. Fong, S. Wan, & C. T. Yang. 2003. Comparison of Antioxidant Activities of Isoflavones from Kudzu Root (*Pueraria labata* Ohwl.). *Journal of Food Science*. 68: 2117-2122
- Jung et al. Antioxidant xanthenes from the pericarp of *Garcinia Mangostana* (Mangosten). Ohio: Nature Sunshine Product. Inc.; 2006.
- Kabeer FA, Rajalekshmi DS, Nair MS, Prathapan R. Molecular mechanisms of anticancer activity of deoxyelephantopin in cancer cells. *Integr Med Res*. 2017; 6(2): 190-206.
- Kamarudin AA, Sayuti NH, Saad N, Razak NAA & Esa NM, Induction of apoptosis by *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. bulb extracted under optimised extraction condition on human retinoblastoma cancer cells (WERI-Rb-1). *J Ethnopharmacol*, 284 (2022) 114770.
- Kamarudin AA, Sayuti NH, Saad N, Razak NAA & Esa NM, Induction of apoptosis by *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. bulb extracted under optimised extraction condition on human retinoblastoma cancer cells (WERI-Rb-1). *J Ethnopharmacol*, 284 (2022) 114770.
- Kandou FEF, Pandiangan D. 2018. Aktivitas antibakteri ekstrak metanol tumbuhan paku diantara *Capillus veneris* dan *Asplenium nidus* terhadap bakteri Gram negatif *Escherichia coli*. *Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sam Ratulangi*. 7(1): 25-28.

- Karak P (2019) Biological activities of flavonoids: an overview. *Int J Pharm Sci Res* 10(4): 1567-1574.
- Katyal P, Bhardwaj N, Khajuria R (2014) Flavonoids and their therapeutic potential as anti cancer agents: mechanism, factors, and regulation. *World J Pharm Pharm Sci* 3(6): 2188-2216.
- Katyal P, Bhardwaj N, Khajuria R (2014) Flavonoids and their therapeutic potential as anti cancer agents: mechanism, factors and regulation. *World J Pharm Pharm Sci* 3(6): 2188-2216.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Riset Kesehatan Dasar Riskesdas. Oleh Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. 2013. <http://www.depkes.go.id/resources/download/general/Hasil%20Riskesdas%202013>.
- Kepmenkes. 2007. Kebijakan Obat Tradisional Nasional Tahun 2007. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 81/Menkes/SK/III/2007. Kementerian Kesehatan RI. Jakarta.
- Khoiri M. 2009. Aktivitas Anti Tumor Ekstrak Etanol pada Sel Tumor Kelenjar Mamari Mencit (*Mus musculus*) C3H. [Tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Kim YJ, Yamabe N, Choi P, Lee JW, Ham J, Kang KS. Efficient thermal deglycosylation of ginsenoside rd and its contribution to the improved anticancer activity of ginseng. *J Agr Food Chem*. 2013;61(38):9185-91. doi: 10.1021/jf402774d
- King, Roger JB, Mike W Robins. *Cancer Biology*. 3rd Edition. London: Pearson Education Limited. 2006.
- Kou N, Liu S, Li X, Li W, Zhong W, Gui L, et al. H19 facilitates tongue squamous cell carcinoma migration and invasion via sponging miR-let-7. *Oncol Res*. 2019;27(2):173-82. doi: 10.3727/096504018X15202945197589
- Kresno SB. Ilmu dasar onkologi. 2d ed. Jakarta: FKUI; 2011. p. 237-83.
- Kubiliene, L.; Laugaliene, V.; Pavilonis, A.; Maruska, A.; Majiene, D.; Barčauskaitė, K.; Kubilius, R.; Kasparavičienė, G.; Savickas, A. Alternative preparation of propolis extracts: Comparison of their composition and biological activities. *BMC Complement. Altern. Med*. 2015, 15, 156. [CrossRef]
- Kumala S, Siswanto EB. 2007. Isolation and Screening of Endophytic from *Morinda citrifolia* and Their Availability to Produce Antimicrobial Substance. *Microbial Indonesia*, 1(3): 145-148.

- Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Robbin SL, Cotran RZ. Robbin and Cotran basic pathology. Philadelphia: Saunders; 2007.
- Kumar V, Abul KA, Nelson F. Pathologic basis of disease. 7th ed. Pennsylvania: Elsevier Saunders. 2007.
- Kumar V, Fausto N, Abbas A. Robbins & Cotran: Dasar patologi penyakit. 7th ed. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC: 2005. p. 26- 32.
- Kuntorini EM, Dewi M & Misrina M, Anatomical structure and antioxidant activity of red bulb plant (*Eleutherine americana*) on different plant age. *Biodiversitas*, 17 (2016) 229.
- Kuntorini EM, Dewi M & Misrina M, Anatomical structure and antioxidant activity of red bulb plant (*Eleutherine americana*) on different plant age. *Biodiversitas*, 17 (2016) 229.
- Kuo, Y.-Y.; Jim, W.-T.; Su, L.-C.; Chung, C.-J.; Lin, C.-Y.; Huo, C.; Tseng, J.-C.; Huang, S.-H.; Lai, C.-J.; Chen, B.-C.; et al. Caffeic Acid Phenethyl Ester Is a Potential Therapeutic Agent for Oral Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 10748–10766. [CrossRef] [PubMed]
- Kuo, Y.-Y.; Lin, H.-P.; Huo, C.; Su, L.-C.; Yang, J.; Hsiao, P.-H.; Chiang, H.-C.; Chung, C.-J.; Wang, H.-D.; Chang, J.-Y.; et al. Caffeic Acid Phenethyl Ester Suppresses Proliferation and Survival of TW2.6 Human Oral Cancer Cells via Inhibition of Akt Signaling. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 8801–8817. [CrossRef] [PubMed]
- Kuspradini H, Susanto D, Ritmaleni, Mitsunaga T. 2012. Phytochemical and comparative study of anti microbial activity of *Lepisanthes amoena* leaves extract. *Biology, Agriculture And Healthcare*. 2(11): 80-86.
- Kusumawati E, Supriningrum R, Rzadi R. 2015. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior* Jack) R. M. SM terhadap *Salmonella typhi*. *Manuntung*. 1(1): 1-7.
- Lamothe RG, Mitchell G, Gattuso M, Diarra MS, Malouin F, Bourab K. 2009. Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. *Molecular sciences*. 10: 3400- 3419.
- Latifah. 2015. “Identifikasi Golongan Senyawa Flavonoid dan Uji Aktivitas Antioksidan Pada Ekstrak Rimpang Kencur *Kaempferia galanga* L. Dengan Metode DPPH (1,1-difenil-2- pikrilhidrazil)”. Skripsi. Malang: Jurusan Kimia. Universitas Islam Negeri Maulana Ibrahim. Hal: 38.
- Lazuardi M, Suharjono S, Chien C-H, He J-L, Lee C-W, Peng C-K, Sukmanadi M, Sugihartuti R, Maslachah L. Toxicity test of flavonoid compounds

- from the leaves of *Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq. using *in vitro* culture cell models. *Vet World*. 2022; 15(12): 2896–902.
- Lecerf C, Le Bourhis X, Adriaenssens E. The long non-coding RNA H19: an active player with multiple facets to sustain the hallmarks of cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(23):4673-87. doi: 10.1007/s00018-019-03240-z
- Lee, Y.-T.; Don, M.-J.; Hung, P.-S.; Shen, Y.-C.; Lo, Y.-S.; Chang, K.-W.; Chen, C.-F.; Ho, L.-K. Cytotoxicity of phenolic acid phenethyl esters on oral cancer cells. *Cancer Lett*. 2005, 223, 19–25. [CrossRef] [PubMed]
- Lee DY, Kang SH, Kim JH, Kim MS, Oh KH, Woo JS, et al. Survival and recurrence of resectable tongue cancer: resection margin cutoff value by T classification. *Head Neck*. 2018;40(2):283-91. doi: 10.1002/hed.24944
- Lee HZ, Liu WZ, Hsieh WT, Tang FY, Chung JG, Leung HW. Oxidative stress involvement in *Physalis angulata*-induce apoptosis in human oral cancer cells. *Food Chem. Toxicol*. 2009; 47: 561 – 570.
- Lestari, N. 2014. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Etanol Daun Gingseng Jawa (*Talinum triangulare* (Jacq.) Willd.) terhadap *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Candida albicans*. Tugas Akhir I, Jurusan Farmasi, FMIPA, Universitas Garut. Garut. Hlm. 1-3, 18-21, 13, 26.
- Liang S, Zhang S, Wang P, Yang C, Shang C, Yang J & Wang J, LncRNA, TUG1 regulates the oral squamous cell carcinoma progression possibly via interacting with Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Gene*, 608 (2017) 49.
- Liang S, Zhang S, Wang P, Yang C, Shang C, Yang J & Wang J, LncRNA, TUG1 regulates the oral squamous cell carcinoma progression possibly via interacting with Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Gene*, 608 (2017) 49.
- Liang Y, Zhang TH, Jing SY, Zuo P, Li TZ, Wang YJ, et al. 20(S)- Ginsenoside Rg3 inhibits lung cancer cell proliferation by targeting EGFR-mediated Ras/Raf/MEK/ERK Pathway. *Am J Chinese Med*. 2021;49(03):753-65. doi: 10.1142/S0192415x2150035x
- Liao J, Qing X, Deng G, Xiao Y, Fu Y, Han S, et al. Gastrodin destabilizes survivin and overcomes pemetrexed resistance. *Cell Signal*. 2023; 110: 110851. doi: 10.1016/j.cellsig.2023.110851.
- Liao YH, Chou WY, Chang CW, Lin MC, Wang CP, Lou PJ, et al. Chemoprevention of oral cancer: A review and future perspectives. *Head Neck*. 2023 Apr; 45(4): 1045–59.
- Li M, Xie H, Liu Y, Xia C, Cun X, Long Y. Knockdown of hypoxia-inducible factor-1 alpha by tumor targeted delivery of CRISPR/Cas9 system

- suppressed the metastasis of pancreatic cancer. *J Control Release*. 2019;304:204-15. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.05.019
- Liu, H., J. Orjala, O. Sticher, dan T. Rali. 1999. Acylated flavonol glycosides from leaves of *Stenochlaena palustri*. *Jurnal Natural Product*. 62: 70-75
- Li X, Ohtsuki T, Koyano T, Kowithayakorn T & Ishibashi M, New Wnt/ $\beta$ -catenin signaling inhibitors isolated from *Eleutherine palmifolia*. *Chem Asian J*, 4 (2009) 540.
- Li X, Ohtsuki T, Koyano T, Kowithayakorn T & Ishibashi M, New Wnt/ $\beta$ -catenin signaling inhibitors isolated from *Eleutherine palmifolia*. *Chem Asian J*, 4 (2009) 540.
- Lopez-Verdin S, Martinez-Fierro ML, Garza-Veloz I, Zamora-Perez A, Grajeda-Cruz J, Gonzalez-Gonzalez R, et al. E-Cadherin gene expression in oral cancer: clinical and prospective data. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2019;24(4):e444-e51. doi: 10.4317/medoral.23029
- Lubis IA, Ichwan M, Mustofa M & Satria D, Anticancer activity of *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. extract on WiDr cell line *in vitro*, paper presented to 2nd Public Health International Conference (PHICo 2017), Faculty of Public Health – Universitas Sumatera Utara, Medan, Indonesia, 18-19 December 2017.
- Lubis IA, Ichwan M, Mustofa M & Satria D, Anticancer activity of *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. extract on WiDr cell line *in vitro*, paper presented to 2nd Public Health International Conference (PHICo 2017), Faculty of Public Health – Universitas Sumatera Utara, Medan, Indonesia, 18-19 December 2017.
- Luliana S, Purwanti Nu, Manihuruk KN. 2016. Pengaruh cara pengeringan simplisia daun senggani (*Melastoma malabathricum* L.) terhadap aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (2,2- difenil-1-pikrilhidrazi). *Pharmaceutical sciences and research*. 3(3): 120-129.
- Luo M, Li Z, Wang W, Zeng Y, Liu Z, Qiu J. Long non-coding RNA H19 increases bladder cancer metastasis by associating with EZH2 and inhibiting E-cadherin expression. *Cancer Lett*. 2013;333(2):213-21. doi: 10.1016/j.canlet.2013.01.033
- Maciejewicz, W. Isolation of Flavonoid Aglycones from Propolis by A Column Chromatography Method and Their Identification By Gc- Ms And Tlc Methods. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol*. 2001, 24, 1171–1179. [CrossRef]

- Mackay RP, Weinberger PM, Copland JA, Mahdavian E, Xu Q. YM155 induces DNA damage and cell death in anaplastic thyroid cancer cells by inhibiting DNA topoisomerase  $\alpha$  at the ATP binding site. *Mol Cancer Ther.* 2022; 21(6): 925-35.
- Madduluri S, Rao KB, Sitaram B. 2013. *In vitro* evaluation of antibacterial activity of five indigenous plants extract against five bacterial pathogens of human. *Pharmacy and pharmaceutical sciences.* 5(4): 679-684.
- Magalhaes HI, Veras ML, Torres MR, Alves AP, Pessoa OD, Silveira, Costa LLV, de Moraes MO, Pessoa C. In-vitro and in-vivo antitumor activity of physalins B and D from *Physalis angulata*. *J. Pharm Pharmacol.* 2006; 58(7): 235 – 241.
- Maharani , D.M., Haidah, S.N., dan Haiyinah. 2013. Studi Potensi Kalakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F) Bedd)), Sebagai Pangan Fungsional, Jurusan Budidaya Pertanian. Universitas Lambung Mangkurat. Banjarbaru.
- Maharani, D.M., Siti, N.H., dan Haiyinah. 2005. “Studi Potensi Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f) Bedd), Sebagai Pangan Fungsional”. PKM Penelitian. Jurusan Budidaya Pertanian. Banjarbaru: Univ Lambung Mangkurat. 13 (1). Hal: 1-13.
- Maharani, Haidah, dan Haiyina. 2005. Studi Potensi Kalakai (*Stenochlaenapalustris* (Burm.F) Bedd) sebagai Pangan Fungsional. Universitas Lambung Mangkurat. Banjarbaru.
- Mahatrinny, N.N., Payani, N.P.S., Oka, I.B.M., dan Astuti, K.W. 2014. “Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Pepaya (*Carica papaya* L.) yang diperoleh dari Daerah Ubud, Kabupaten Gianyar, Bali”. *Jurnal Farmasi Udayana.* Vol. 3 (1): 8-13.
- Maisarah AM, Asmah R, Faisal A, Rajesh R (2017) Nutritional compositions and antiproliferative activities of different solvent fractions from ethanol extract of *Cyphomandra betacea* (tamarillo) fruit. *Malays J Med Sci* 24(5): 19-32.
- Makhafola, T.J.; Elgorashi, E.; McGaw, L.J.; Verschaeve, L.; Jn, E. The correlation between antimutagenic activity and total phenolic content of extracts of 31 plant species with high antioxidant activity. *BMC Complement. Altern. Med.* 2016, 16, 490. [CrossRef]
- Makiyah A, Tresnayanti S. Uji toksisitas akut yang diukur dengan penentuan LD50 ekstrak etanol umbi iles-iles (*Amorphophallus variabilis* Bl.) pada tikus putih strain Wistar. *Maj Kedokt Bandung* 2017; 49(3): 145–55.

- Maliangkay HP, Rumondor R, Walean M. Uji efektivitas antidiabetes ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L) pada tikus putih (*Rattus novergicus*) yang diinduksi aloksan. *Chem Prog.* 2018; 11(1): 15–21.
- Mankinen, G.W. dan Gelfer, B. 1982. *Compressive Use Peat in The USSR.* DOE 5th Technical Conference of Peat.
- Maradona D. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Durian (*Durio zibehinus* L.), Daun Lengkek (*Dimocarpus Longan* Lour.) dan Daun Rambutan (*Niphelium lappaceum* L.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25925 dan *Escherichia coli* ATCC 25922. [Skripsi]. Jakarta (ID): Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Mardiyarningsih A, Ismiyati N (2014) Cytotoxic activity of ethanolic extract of *Persea americana* Mill. leaves on HeLa cervical cancer cell. *Trad Med J* 19: 24–28. doi: 10.22146/tradmedj.8087
- Margono DPNH, Suhartono E, Arwati H (2016) Potensi ekstrak kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f) Bedd) terhadap kadar tumor necrosis factor alfa (TNF-  $\alpha$ ) pada mencit BALB/c yang diinfeksi *Plasmodium berghei* Anka. *Berkala Kedokteran* 12: 77–85. doi: 10.20527/jbk.v12i1.359
- Markopoulos AK (2012) Current aspects on oral squamous cell carcinoma. *Open Dent J* 6: 126-130.
- Maya D W Matondo, Mewono L, Nkoma A M, Issifou S, and Mavoungou E. 2008. Markers of vascular endothelial cells damage and *P.falciparum* malaria: association between levels of both sE-selectine and thrombomodulin, and cytokines, hemoglobin and clinical presentation. *Eur Cytokine Netw*, vol.19 no.3, September 2008, 123-30.
- Maya F, Inna A, Dita B, Adam H, Muthi I, Edy M. Ekstrak etanolik herba ciplukan (*Physalis angulata* L.) berefek sitotoksik dan menginduksi apoptosis pada sel kanker payudara MCF- 7. *Jurnal Bionatura.* 2011; 13(2): 101 – 107.
- Mebas DPSE, Biworo A, Wydiamala E. Uji aktivitas larvasida ekstrak etanol kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm . F .) Bedd) terhadap larva nyamuk *aedes aegypti*. *Homeostasis.* 2021 Apr; 4(1): 17–24
- Meles DK, Wurlina W, Mustofa I, Zakaria S, Basori A, Hariadi M, Safitri E, Cempaka Putri DKS, Suwasanti N. Toxicity, stability and renal histopathology of alkaloid of jarong (*Achyranthes aspera* Linn.)

- (Caryophyllales: Amaranthaceae) leaf on mice. *Philipp J Vet Med.* 2018; 55(Special Issue): 35–42.
- Mendonsa AM, Na TY, Gumbiner BM. E-cadherin in contact inhibition and cancer. *Oncogene.* 2018;37(35):4769-80. doi: 10.1038/s41388-018-0304-2
- Miftahul K. 2012. Skrining Fitokimia Kandungan Golongan Senyawa yang terdapat pada Daun Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F) Bedd) sebagai Obat Tradisional. Tugas Akhir Ahli Madya Farmasi, Jurusan Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Palangkaraya. Palangkaraya.
- Minhas S, Kashif M, Altaf W, Afzal N & Nagi AH, Concomitant-chemoradiotherapy-associated oral lesions in patients with oral squamous-cell carcinoma. *Cancer Biol Med,* 14 (2017) 176.
- Minhas S, Kashif M, Altaf W, Afzal N & Nagi AH, Concomitant-chemoradiotherapy-associated oral lesions in patients with oral squamous-cell carcinoma. *Cancer Biol Med,* 14 (2017) 176.
- Miranda-Filho A, Bray F. Global patterns and trends in cancers of the lip, tongue and mouth. *Oral Oncol.* 2020;102:104551. doi: 10.1016/j.oraloncology.2019.104551
- Mohanty S, Patel D K, Pati S S, and Mishra S K. 2006. Adjuvant therapy in cerebral malaria. *Indian J Med Res,* September 2006, pp 245-260.
- Moningka MEW (2019) Perkembangan terapi kanker terkait senyawa terpineol, p53 dan caspase 3. *J eBiomedik* 7: 37–43. doi: 10.35790/ebm.7.1.2019.23190
- Montero PH, Patel SG (2015) Cancer of the oral cavity. *Surg Oncol Clin N Am* 24(3): 491-508.
- Moongkarndi P, Kosem N, Kaslungka S, Luanra-tana O, Pongpan N, Neungton N. Antiproliferation, antioxidation and induction of apoptosis by *Garcinia mangostana* (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line. *J Ethno-Pharmacol* 2004;90:161-6.
- Mutalib MA, Ali F, Othman F, Ramasamy R, Rahmat A (2016) Phenolics profile and anti-proliferative activity of *Cyphomandra betacea* fruit in breast and liver cancer cells. *Springerplus* 5(1): 2105.
- Mutiah R, Listiyana A, Suryadinata A, Annisa R, Hakim A, Anggraini W & Susilowati R, Activity of inhibit the cell cycle and induct apoptosis in HeLa cancer cell with combination of sabrang onion (*Eleutherine palmifolia*

- (L.) Merr) and starfruit mistletoe (*Macrosolen cochinchinensis* (Lour.) Tiegh). *J App Pharm Sci*, 8 (2018) 122.
- Mutiah R, Listiyana A, Suryadinata A, Annisa R, Hakim A, Anggraini W & Susilowati R, Activity of inhibit the cell cycle and induct apoptosis in HeLa cancer cell with combination of sabrang onion (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr) and starfruit mistletoe (*Macrosolen cochinchinensis* (Lour.) Tiegh). *J App Pharm Sci*, 8 (2018) 122.
- Mutiah R, Listiyana A, Suryadinata A (2017) Aktivitas antikanker kombinasi ekstrak benalu belimbing (*Macrosolen cochinchinensis*) dan bawang sabrang (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr.) pada sel kanker serviks (sel HeLa). *Trad Med J* 22: 146–152. doi: 10.22146/mot.22009
- Mutiah R, Minggarwati TS, Kristanti RA & Susanti E, Compound identification and anticancer activity of ethyl acetate fraction from bawang sabrang (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr.) on HeLa cervical cancer cell line. *Indones J Cancer Chemoprevent*, 10 (2019) 131.
- Mutiah R, Minggarwati TS, Kristanti RA & Susanti E, Compound identification and anticancer activity of ethyl acetate fraction from bawang sabrang (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr.) on HeLa cervical cancer cell line. *Indones J Cancer Chemoprevent*, 10 (2019) 131.
- Naeem A, Hu P, Yang M, Zhang J, Liu Y, Zhu W, Zheng Q. Natural products as anticancer agents: Current status and future perspectives. *Molecules*. 2022; 27(23): 8367. doi: 10.3390/ molecules27238367.
- Nair Madhavan P, et al. 2006. The Flavonoid Quercetin Inhibits Proinflammatory Cytokine (TNF Alpha) Gene Expression in Normal Peripheral Blood Mononuclear Cells Via Modulation of The NF- $\kappa$ B System. *Clinical and Vaccine Immunology*, Mar, Vol 13, No. 3, pp 319-328.
- Naritasari F, Susanto H, Supriatno. Pengaruh konsentrasi ekstrak etanol bonggol nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) terhadap apoptosis karsinoma sel skuamosa lidah manusia. *Majalah Obat Tradisional*. 2010; 15(1): 16–25.
- Narmada IB, Laksono V, Nugraha AP, Ernawati DS, Winias S, Prahasanti C, Dinaryanti A, Susilowati H, Hendrianto E, Ihsan IS, Rantam FA. Regeneration of salivary gland defects of diabetic Wistar rats post human dental pulp stem cells intraglandular transplantation on acinar cell vacuolization and interleukin-10 serum level. *Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr*. 2019; 19(1): 1–10.

- Na TY, Schecterson L, Mendonsa AM, Gumbiner BM. The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(11):5931-7. doi: 10.1073/pnas.1918167117
- Neldawati, Ratnawulan dan Gusnedi. 2013. Analisis Nilai Absorbansi dalam Penentuan Kadar Flavonoid untuk Berbagai Jenis Daun Tanaman Obat. *Pillar of Physics*. 2:76-83
- Neldawati, Ratnawulan dan Gusnedi. 2013. "Analisis Nilai Absorbansi dalam Penentuan Kadar Flavonoid untuk Berbagai Jenis Daun Tanaman Obat". *Pillar Of Physics*. Vol. 2. Hal: 76-83.
- Neville BW & Day TA, Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin*, 52 (2002) 195.
- Neville BW & Day TA, Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin*, 52 (2002) 195.
- Nguyen PAT, Khang DT, Nguyen PTT, Do HDK. The complete chloroplast genome of *Elephantopus scaber* L. (Vernonioideae, asteraceae), a useful ethnomedicinal plant in Asia. *Mitochondrial DNA B Resour*. 2023; 8(9): 936-41.
- Noorcahyati. Tumbuhan berkhasiat obat etnis asli kalimantan. Balikpapan: Balai Penelitian Teknologi Konservasi Sumber Daya Alam; 2012.
- Novita M, Firdaus IWAK, Taufiqurrahman I. Antibacterial effectiveness of *stenochlaena palustris* leaves extract against the growth of *streptococcus mutans*. *Dentino (Jur. Ked. Gigi)*. 2022 Sept; 7(2): 174–80.
- Ntie-Kang, F et al. 2014. The Potential of Anti-malarial Compounds Derived From African Medicinal Plants, Part II: a Pharmacological Evaluation of NonAlkaloids and Non-Terpenoids. *Malaria Journal*, 13:81.
- Nurhasnawati H, Sundu R, Sapri S, Supriningrum R, Kuspradini H, Arung ET (2019) Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of several indigenous species of ferns in East Kalimantan, Indonesia. *Biodiversitas* 20: 576–580. doi: 10.13057/biodiv/d200238
- Nuria MC, Faizatun A, Sumantri. 2009. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Salmonella typhi* ATCC 1408. *Mediagro*. 5(2): 26-37.
- Nurjanah S, Isbiyantoro, Fadhillah H. 2018. Ekstrak daun kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) sebagai antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* dan *Stretococcus sanguinis*. *Farmasi lampung*. 7(1): 33- 40.

- Nurmilatina. Analisis komposisi kimia daun kelakai (*stenochlaena palustris* Bedd.) dengan berbagai pelarut menggunakan GCMS. *Jurnal Riset Industri Hasil Hutan*. 2017 Okt; 9(1): 9–16.
- Nurmilatina N (2017) Analisis komposisi kimia daun kelakai (*Stenochlaena palustris* Bedd.) dengan berbagai pelarut menggunakan GCMS. *J Ris Ind Hasil Hutan* 9: 9–16. doi: 10.24111/jrihh.v9i1.2952
- Oktaviono YH, Al-Farabi MJ, Suastika LOS, Hartono F, Dirgantara Y& Sandra F, Preliminary study: Purple sweet potato extract seems to be superior to increase the migration of impaired endothelial progenitor cells compared to L-Ascorbic acid. *Sci Pharm*, 87 (2019) 16.
- Oktaviono YH, Al-Farabi MJ, Suastika LOS, Hartono F, Dirgantara Y& Sandra F, Preliminary study: Purple sweet potato extract seems to be superior to increase the migration of impaired endothelial progenitor cells compared to L-Ascorbic acid. *Sci Pharm*, 87 (2019) 16.
- Olson J. 2004. *Belajar Mudah Farmakologi*. Jakarta (ID): Buku Kedokteran.
- Ooi, Muhammad, Sulaiman. Physalin F from *physalis minima* L. Triggers apoptosis-based cytotoxic mechanism in T-47D cells through the activation caspase-3- and c-myc-dependent pathways. *J. Ethnopharmacol*. 2013; 150(1): 382 – 388.
- Osman M, Milan AR. *Mangosteen Garcinia Mangostana* L. Chichester (UK): Southampton Centre of Underutilized Corps.; 2006
- Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci*. 2016; 5: e47.
- Pandey SK, Paul A, Shteinfer-Kuzmine A, Zalk R, Bunz U, Shoshan Barmatz V. SMAC/diablo controls proliferation of cancer cells by regulating phosphatidylethanolamine synthesis. *Mol Oncol*. 202; 15(11): 3037-61.
- Paramawati R. *Dahsyatnya manggis untuk menumpas penyakit*. Jakarta: Agromedia; 2010.
- Parashar, K.; Sood, S.; Mehaidli, A.; Curran, C.; Vegh, C.; Nguyen, C.; Pignaneli, C.; Zhang, Z.; Liang, G.; Wang, Y.; et al. Evaluating the Anti-cancer Efficacy of a Synthetic Curcumin Analog on Human Melanoma Cells and Its Interaction with Standard Chemotherapeutics. *Molecules* 2019, 24, 2483. [CrossRef]
- Park S, Cho Y, Lee J, Koh YW, Kim SH, Choi EC, et al. Survival and functional outcome after treatment for primary base of tongue cancer: a comparison of definitive chemoradiotherapy versus surgery followed

- by adjuvant radiotherapy. *Cancer Res Treat.* 2018;50(4):1214-25. doi: 10.4143/crt.2017.498
- Peperstraete E, Lecerf C, Collette J, Vennin C, Raby L, Volkel P, et al. Enhancement of breast cancer cell aggressiveness by lncRNA H19 and its Mir-675 derivative: insight into shared and different actions. *Cancers (Basel).* 2020;12(7). doi: 10.3390/cancers12071730
- Pfister DG, Spencer S, Adelstein D, Adkins D, Anzai Y, Brizel DM, et al. Head and neck cancers. *J Natl Compr Canc Netw.* 2020 Jul; 18(7): 873–98.
- Phi LT, Sari IN, Wijaya YT, Kim KS, Park K, Cho AE, et al. Ginsenoside Rd inhibits the metastasis of colorectal cancer via epidermal growth factor receptor signaling axis. *IUBMB Life.* 2019;71(5):601-10. doi: 10.1002/iub.1984
- Piekarz, T.; Mertas, A.; Wiatrak, K.; Rój, R.; Kownacki, P.; Smieszek-Wilczewska, J.; Kopczyńska, E.; Wrzoł, M.; Cisowska, M.; Szliszka, E.; et al. The Influence of Toothpaste Containing Australian Melaleuca alternifolia Oil and Ethanolic Extract of Polish Propolis on Oral Hygiene and Microbiome in Patients Requiring Conservative Procedures. *Molecules* 2017, 22, 1957. [CrossRef]
- Pobiega, K.; Kraśniewska, K.; Derewiaka, D.; Gniewosz, M. Comparison of the antimicrobial activity of propolis extracts obtained by means of various extraction methods. *J. Food Sci. Technol.* 2019, 56, 5386–5395. [CrossRef]
- Polz gruszka D, Macieląg P, Fołtyn S, Polz-dacewicz M (2014) Oral squamous cell carcinoma (OSCC) – molecular, viral and bacterial concepts. *J Pre-Clinical Clin Res* 8(2): 61-66.
- Poonacha SK, Harishkumar M, Radha M, Varadarajan R, Nalilu SK, Shetty SS, Shetty PK, Chandrashekharappa RB, Sreenivas MG & Bavabeedu SKB, Insight into oroxylinA-7-O-β-d-glucuronide-enriched Oroxyllum indicum bark extract in oral cancer HSC-3 cell apoptotic mechanism: Role of mitochondrial microenvironment. *Molecules*, 26 (2021) 7430.
- Poonacha SK, Harishkumar M, Radha M, Varadarajan R, Nalilu SK, Shetty SS, Shetty PK, Chandrashekharappa RB, Sreenivas MG & Bavabeedu SKB, Insight into oroxylinA-7-O-β-d-glucuronide-enriched Oroxyllum indicum bark extract in oral cancer HSC-3 cell apoptotic mechanism: Role of mitochondrial microenvironment. *Molecules*, 26 (2021) 7430.
- Popova, M.; Giannopoulou, E.; Skalicka-Woźniak, K.; Graikou, K.; Widelski, J.; Giannopoulou, E.; Kalofonos, H.P.; Sivolapenko, G.; Gawel-Beben,

- K.; Antosiewicz, B.; et al. Characterization and Biological Evaluation of Propolis from Poland. *Molecules* 2017, 22, 1159. [CrossRef] [PubMed]
- Prakosa T, Askandar B, Fauziah D (2013) Ekspresi p53 mutan dan caspase 3 sebagai faktor prediksi terhadap operabilitas kanker serviks IIB setelah mendapat kemoterapi neoadjuvan. *Indones J Cancer* 7: 61–67. doi: 10.33371/ijoc.v7i2.296
- Pratiwi L, Fudholi A, Martien R, Pramono S (2016) Ethanol extract, ethyl acetate extract, ethyl acetate fraction, and n-heksan fraction mangosteen peels (*Garcinia mangostana* L.) as source of bioactive substance free-radical scavengers. *J Pharm Sci Clin Res* 1: 71– 82. doi: 10.20961/jpscr.v1i2.1936
- Pratiwi RH. 2017. Mekanisme pertahanan bakteri patogen terhadap antibiotik. *Pro-life* 4(3): 418- 429.
- Premkumar DR, Jane EP, Foster KA, Pollack IF. Survivin inhibitor YM-155 sensitizes tumor necrosis factor- related apoptosis inducing ligand-resistant glioma cells to apoptosis through Mcl-1 downregulation and by engaging the mitochondrial death pathway. *J Pharmacol Exp Ther.* 2013; 346(2): 201-10.
- Przybyłek, I.; Karpiński, T.M. Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules* 2019, 24, 2047. [CrossRef]
- Pucci B, Kasten M & Giordano A, Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia*, 2 (2000) 291.
- Pucci B, Kasten M & Giordano A, Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia*, 2 (2000) 291.
- Purnamasari P, Purnawati RD, Susilaningsih N. Pengaruh ekstrak daun sukun dan madu terhadap gambaran mikroskopik ginjal tikus Wistar yang diinduksi dietilnitrosamin. *Diponegoro Med J.* 2018; 7(2): 1391–405.
- Qazi MA, Molvi KI (2016) Herbal medicine: a comprehensive review. *Int J Pharm Res* 8: 1-5.
- Quadros Gomes AR, da Rocha Galucio NC, de Albuquerque KCO, Brígido HPC, Varela ELP, Castro ALG, Vale VV, Bahia MO, Rodriguez Burbano RM, de Molfeta FA, Carneiro LA, Percario S & Dolabela MF, Toxicity evaluation of *Eleutherine plicata* Herb. extracts and possible cell death mechanism. *Toxicol Rep*, 8 (2021) 1480.
- Quadros Gomes AR, da Rocha Galucio NC, de Albuquerque KCO, Brígido HPC, Varela ELP, Castro ALG, Vale VV, Bahia MO, Rodriguez Burbano

- RM, de Molfeta FA, Carneiro LA, Percario S & Dolabela MF, Toxicity evaluation of *Eleutherine plicata* Herb. extracts and possible cell death mechanism. *Toxicol Rep*, 8 (2021) 1480.
- Rachmawati AS. Prevalensi kanker di rumah sakit jasa kartini kota tasikmalaya tahun 2018. *Jurnal Kesehatan Komunitas Indonesia*. 2020 Mar; 16(1): 119–26.
- Rafe MASR, Gaina CD, Ndaong NA. Gambaran histopatologi ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang diberi infusa pare lokal pulau Timor. *J Vet Nusant*. 2019; 3(1): 61–73.
- Rahayuwati L, Rizal IA, Pahria T, Lukman M, Juniarti N. Pendidikan kesehatan tentang pencegahan penyakit kanker dan menjaga kualitas kesehatan. *Media Karya Kesehatan*. 2020 Mei; 3(1): 59–69.
- Rahman MN, Wijaya CR, Novalentina M. Survivin clinical features in cervical cancer. *Mol Cell Biomed Sci*. 2017; 1(1): 6-16.
- Rahmat, H. 2009. “Identifikasi Senyawa Flavonoid Pada Sayuran Indigenous Jawa Barat”. Skripsi. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian. Hal: 4,20.
- Rassu, G.; Cossu, M.; Langasco, R.; Carta, A.; Cavalli, R.; Giunchedi, P.; Gavini, E. Propolis as lipid bioactive nano-carrier for topical nasal drug delivery. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2015, 136, 908–917. [CrossRef]
- Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L & Zhang L, Flavonoids: Promising anticancer agents. *Med Res Rev*, 23 (2003) 519.
- Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L & Zhang L, Flavonoids: Promising anticancer agents. *Med Res Rev*, 23 (2003) 519.
- Ren ZG, Chen XM, Hong LJ, Zhao XX, Cui GY, Li A, et al. Nanoparticle conjugation of Ginsenoside Rg3 inhibits hepatocellular carcinoma development and metastasis. *Small*. 2020;16(2):e1905233. doi: 10.1002/sml.201905233
- Reyes M, Flores T, Betancur D, Peña-Oyarzún D, Torres VA. Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling in oral carcinogenesis. *International Journal Molecular Sciences*. 2020 Jun; 21.
- Rezkita F, Wibawa KGP, Nugraha AP. Curcumin loaded chitosan nanoparticle for accelerating the post extraction wound healing in diabetes mellitus patient: a review. *Res J Pharm Technol*. 2020; 13(2): 1039–42.
- Ribeiro, D.R.; Alves Ângela, V.F.; Dos Santos, E.P.; Padilha, F.F.; Gomes, M.Z.; Rabelo, A.S.; Cardoso, J.; Massarioli, A.P.; Alencar, S.M.; De

- Albuquerque-Júnior, R.L.C.; et al. Inhibition of DMBA-induced Oral Squamous Cells Carcinoma Growth by Brazilian Red Propolis in Rodent Model. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2015, 117, 85–95. [CrossRef]
- Rikomah SE, Yanti YS, Juarsah W. 2017. Uji daya hambat ekstrak etanol daun pudung hitam (*Graptophyllum pictum*) pada pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. *Sains dan Teknologi Farmasi.* 19(1): 22-26.
- Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, et al. (2019) Cell viability assays. *Assay guidance manual* pp. 295-320.
- Rivera C, Venegas B (2014) Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). *Oncol Let* 8(1): 7-11.
- Rizal MI & Sandra F, Brucea javanica leaf extract activates caspase-9 and caspase-3 of mitochondrial apoptotic pathway in human oral squamous cell carcinoma. *Indones Biomed J*, 8 (2016) 43.
- Rizal MI & Sandra F, Brucea javanica leaf extract activates caspase-9 and caspase-3 of mitochondrial apoptotic pathway in human oral squamous cell carcinoma. *Indones Biomed J*, 8 (2016) 43.
- Rohaeti, E., Heryanto, R., Fari, M., Wahyuningrum, A., Darusman, L. 2011. Prediksi Kadar Flavonoid Total Tempuyung (*Sonchus oleraceus* L.) Menggunakan Kombinasi Spektroskopi Ir Dengan Regresi Kuadrat Terkecil Parsial. *JURNAL KIMIA*, 5 (2): 101-108.
- Rohman, A. & S. Riyanto. 2005. Antioxidant potency of ethanolic extract of Kemuning leaves (*Murraya paniculata* (L) Jack ) *in vitro*. *Majalah Farmasi Indonesia.* 16:136-140.
- Rokavec M, Horst D, Hermeking H. Cellular model of colon cancer progression reveals signatures of mRNAs, miRNA, lncRNAs, and epigenetic modifications associated with metastasis. *Cancer Res.* 2017;77(8):1854- 67. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-3236
- Roleira, F.M.F.; Da Silva, E.J.T.; Varela, C.; Costa, S.; Silva, T.; Garrido, J.; Borges, F. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. *Food Chem.* 2015, 183, 235–258. [CrossRef] [PubMed]
- Rostinawati, T. 2010. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Herba Tespong (*Oenanthe javanica* D.C) terhadap *Escheria coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Candida albicans*. *Penelitian Mandiri, Jurusan Farmasi, Universitas Padjajaran. Jatinangor.* Hlm. 1, 20, 23, 25.
- Rostinawati T, Suryana S, Fajrin M, Nugrahani. 2015. Aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun kelakai (*Stenochlaena palustris*) terhadap

- Salmonella typhi dan Staphylococcus aureus dengan metode difusi agar CLSI M02-A11. Farmasi Universitas Halu Oleo. 3(1): 1-5.
- Rostinawati T, Suryana S, Fajrin M, Nugrahani H (2018) Aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F) Bedd) terhadap Salmonella typhi dan Staphylococcus aureus dengan metode difusi agar CLSI M02-A11. Pharmauho 3: 1–5. doi: 10.33772/pharmauho.v3i1.3444
- Rostinawati T, Suryana S, Fajrin M, Nugrahani H. Aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm. F) terhadap salmonella thypi dan staphylococcus aureus dengan metode difusi agar CLSI M02-A11; 2018.
- Russo, A.; Cardile, V.; Sánchez, F.; Troncoso, N.; Vanella, A.; Garbarino, J. Chilean propolis: Antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. Life Sci. 2004, 76, 545–558. [CrossRef]
- Safitri RA, Saptarini O, Sunarni T. Uji aktivitas sitotoksik, ekspresi p53, dan Bcl-2 dari ekstrak fraksi herba kelakai (*stenochleana palustris* (Burm.F) Bedd.) terhadap sel kanker payudara T47D. J Biotek Medisiana Indones. 2020 Sept; 9(2): 113–27.
- Saftri UH, Nawangsih EF, Noviyanti ND, Nur'aini F, Apliani D, Haniastuti T. Studi *in vivo* ekstrak etanolik ciplukan (*Physalis angulata*) dalam meningkatkan apoptosis sel kanker lidah. Majalah Kedokteran Gigi Indonesia. 2016 Des; 2(3): 109–15.
- Sahinler, N.; Kaftanoglu, O. Natural product propolis: Chemical composition. Nat. Prod. Res. 2005, 19, 183–188. [CrossRef] [PubMed]
- Sahu U, Sahoo P K, Kar S K, Mohapatra B N, and Ranjit M. 2013. Association of TNF level with production of circulating cellular microparticles during clinical manifestation of human cerebral malaria. Human Immunology 74 (2013) 713-721.
- Saifuddin. 2014. Senyawa Alam Metabolit Sekunder. Yogyakarta (ID): Deepublish.
- Sajjadi SE, Ghanadian M, Haghighi M, Mouhebat L. Cytotoxic effect of *Cousinia verbascifolia* Bunge against OVCAR-3 and HT-29 cancer cells. J Herbmed Pharmacol. 2015; 4(1): 15-19.
- Salamah, N. & E. Widyasari. 2015. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Kelengkeng (*Euphoria Longan* (L) Steud.) Dengan Metode Penangkapan Radikal 2,2'-Difenil-1- Pikrilhidrazil. Pharmacia. 1: 23-29.

- Salehi, M.; Motallebnejad, M.; Moghadamnia, A.A.; Seyemajidi, M.; Khanghah, S.N.; Ebrahimpour, A.; Molania, T. An Intervention Airing the Effect of Iranian Propolis on Epithelial Dysplasia of the Tongue: A Preliminary Study. *J. Clin. Diagn. Res.* 2017, 11, ZC67–ZC70. [CrossRef]
- Salim Z, Munadi E (2017) Info komoditi tanaman obat. Jakarta: Badan Pengkajian dan Pengembangan Perdagangan Kementerian Perdagangan Republik Indonesia.
- Sandra F & Sidharta MA, Caffeic acid induced apoptosis in MG63 osteosarcoma cells through activation of caspases. *Mol Cell Biomed Sci*, 1 (2017) 28.
- Sandra F & Sidharta MA, Caffeic acid induced apoptosis in MG63 osteosarcoma cells through activation of caspases. *Mol Cell Biomed Sci*, 1 (2017) 28.
- Sandra F, Hendarmin L, Nakao Y, Nakamura N, Nakamura S. TRAIL cleaves caspase-8,-9 and-3 of AM-1 cells: A possible pathway for TRAIL to induce apoptosis in ameloblastoma. *Tumor Biol.* 2005; 26(5): 258-64.
- Sandra F, Rizal MI, Dhaniar AY, Scania AE, Lee KH. Cosmos caudatus leaf extract triggers apoptosis of HSC-3 cancer cells by decreasing bcl-2 and increasing bax. *Indones Biomed J.* 2024; 16(3): 285-91.
- Sandra F, Sudiono J, Trisfilha P & Pratiwi D, Cytotoxicity of *Alpinia galanga* rhizome crude extract on NIH-3T3 cells. *Indones Biomed J*, 9 (2017) 23.
- Sandra F, Sudiono J, Trisfilha P & Pratiwi D, Cytotoxicity of *Alpinia galanga* rhizome crude extract on NIH-3T3 cells. *Indones Biomed J*, 9 (2017) 23.
- Sapri, Ana, F, dan Rizka, N., 2014. “Pengaruh Ukuran Serbuk Simplisia Terhadap Rendemen Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Dengan Metode Maserasi”. *Prosiding Seminar Nasional Kimia. Akademi Farmasi.* Hal: 1-4.
- Sari LM (2018) Apoptosis: Mekanisme molekuler kematian sel. *Cakradonya Dent J* 10: 65–70. doi: 10.24815/cdj.v10i2.11701
- Sari LM. *Aktivitas Antioksidan dan Sitotoksitas Biji Pinang pada Karsinoma Sel Skuamosa Mulut.* Banda Aceh: Syiah Kuala University Press; 2019.
- Sawaya, A.C.; Cunha, I.B.D.S.; Marcucci, M.C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chem. Central J.* 2011, 5, 1–10. [CrossRef]
- Schwartz. *Principles of Surgery 7th.* Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. 2000.

- Seca AML, Pinto DCGA (2018) Plant secondary metabolites as anticancer agents: successes in clinical trials and therapeutic application. *Int J Mol Sci* 19(1): 263-284.
- Setyorini D, Firdaus IWAK, Oktiani BW. Comparison of inhibitory activity of kelakai leaves extract with Ciprofloxacin against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC® 6514TM. *Dentino J Kedokt Gigi*. 2019; 4(2): 199–204.
- Sforcin, J.M. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phytotherapy Res*. 2016, 30, 894–905. [CrossRef] [PubMed]
- Shafira N, Ayu PR, Susianti. Potensi Bit merah (*Beta vulgaris* L.) sebagai nefroprotektor dari kerusakan ginjal akibat radikal bebas. *MEDULA Med Prof J Univ Lampung*. 2019; 9(2): 322–7.
- Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen T, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*. 2014;343(6166):84-7. doi: 10.1126/science.1247005
- Sharma, P., Bhardwaj, P., Arif, T., Khan, I., Singh, R. 2014. Pharmacology, Phytochemistry and Safety of Aphrodisiac Medicinal Plants: A Review. *RRJPTS*. Volume 2, Issue 3.
- Shetty SS, Kudpaje A, Jayaraj R, Rao V, Shah PK. Tongue cancer: a discrete oral cavity subsite. *Oral Oncol*. 2019;99:104348. doi: 10.1016/j.oraloncology.2019.06.029
- Shinta. dan Atyk. 2011. “Kalakai” Sayuran Lokal Potensial dan Kaya Manfaat. Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Kalimantan Tengah. <http://kalteng.litbang.pertanian.go.id/ind/index.php/publikasi-mainmenu47/artikel/185-kalakai-sayuran-lokalpotensial-dan-kaya-manfaat>
- Shirotake S. 2014. A new cyanoacrylate colloidal polymer with novel antibacterial mechanism and its application to infection control. *Nanomedicine Biotherapeutic Discovery*. 4(1): 1-7.
- Shrestha AD, Vedsted P, Kallestrup P, Neupane D. Prevalence and incidence of oral cancer in low- and middleincome countries: a scoping review. *Eur J Cancer Care*. 2019 Mar; 29(2): e13207.
- Sia D, Villanueva A, Friedman SL, Llovet JM (2017) Liver cancer cell of origin, molecular class, and effects on patient prognosis *Gastroenterology* 152: 745– 761. doi: 10.1053/j.gastro.2016.11.048
- Silalahi, J. 2006. Makanan Fungsional. Cetakan ke 6. Yogyakarta: Penerbit Kanisius. Hal: 121.

- Silverman J, Suckow MA, Murthy S. The IACUC Handbook. 3rd ed. St Louis: CRC Press Taylor & Francis Group; 2014. p. 377–416.
- Sirait. Faktor resiko tumor/kanker rongga mulut dan tenggorokan di Indonesia (Analisis Riskesdas 2007). Media Litbangkes. 2007; 2(3): 122 – 129.
- Sirait AM (2013) Faktor risiko tumor/kanker rongga mulut dan tenggorokan di Indonesia (Analisis Riskesdas 2007). Media Litbangkes 23(3): 122-129.
- Sirait PS, Setyaningsih I, Tarman K (2019) Aktivitas antikanker ekstrak *Spirulina* yang dikultur pada media walne dan media organik. J Pengolahan Hasil Perikanan Indones 22: 50–59. doi: 10.17844/jphpi.v22i1.25876
- So YK, Oh D, Choi N, Baek CH, Ahn YC, Chung MK. Efficacy of postoperative neck irradiation for regional control in patients with pN0 oral tongue cancer: propensity analysis. Head Neck-J Sci Spec. 2018;40(1):163-9. doi: 10.1002/hed.24980
- Suanto E. Efek ekstrak etanol kulit manggis. (*Garcinia mangostana* Linn) terhadap pertumbuhan sel kanker lidah manusia SP-C1 *in vitro*. Thesis. Bandung: Universitas Padjadjaran; 2011.
- Subramaniam K, Suriyamoorthy S, Wahab F, Sharon FB & Rex GR, Antagonistic activity of *Eleutherine palmifolia* Linn. Asian Pac J Trop Dis, 2 (2012) S491.
- Subramaniam K, Suriyamoorthy S, Wahab F, Sharon FB & Rex GR, Antagonistic activity of *Eleutherine palmifolia* Linn. Asian Pac J Trop Dis, 2 (2012) S491.
- Sudira W, Merdana M, Winaya IBO, Parnayasa IK. Histopathological changes in white rat's kidney given ant nest extract induced paracetamol toxic dose. Bul Vet Udayana. 2019; 11(2): 136–46
- Sudjarwo, Widiastuti H, Primaharinastiti P, Prihatiningtyas S. Toxicity test from *Gloriosa Superba* L leaves extract in rats (*Rattus Novegicus*). Int J Pharm Pharm Sci. 2014; 6(5): 183–7.
- Sudjarwo S A. 2005. The Potency of Piperine as Antiinflammatory and Analgesic in Rats and Mice. *Folia Medica Indonesiana*, vol.41, no.3.
- Suhartono, E., Ella, V., Mustaqim A.R., Imam S.G., Muhammad F.R., and Danny I. 2012. “Total flavonoid and Antioxidant Acivity of Some Selected Medicinal Plants in South Kalimantan of Indonesia”. Univ Lambung Mangkurat. *Procedia APCBEE*. Vol. 4. Hal: 235-239.

- Suhartono, Eko et al. 2012. Total Flavonoid and Antioxidant Activity of Some Selected Medicinal Plants in South Kalimantan of Indonesian. *APCBEE Procedia* 4 (2012) 235-239.
- Suhartono E, Bakhriansyah M, dan Handayani R. 2010. Efek Ekstrak *Stenochlaena palustris* terhadap jumlah circulating endothelial cells *Marmota calligata* setelah didemamkan. *Majalah Farmasi Indonesia*, 21(3), 166-170, 2010.
- Suling L, Augustina I, Fatmaria F (2020) Uji daya bunuh ekstrak etanol 70% kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F.) Bedd) terhadap larva instar III *Aedes aegypti*. *Herb Med J* 3: 6–11. doi: 10.30595/hmj.v3i1.6375
- Sulistiyani N, Nurkhasanah. The cytotoxic effect of *Elephantopus scaber* Linn extract against breast cancer (T47D) cells. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng*. 2017; 259: 012006. doi: 10.1088/1757- 899X/259/1/012006
- Supomo., Risa, S., dan Risaldi, J. 2016. “Karakterisasi dan Skrining Fitokimia Daun Kerehau (*Callicarpa longifolia* Lamk.)”. *Jurnal Kimia Mulawarman*. Vol. 13 (2): 89-96.
- Supriatno, Adityawan F, Dentawan F, Pritama AS. *Kanker Mulut*. 1st ed. Yogyakarta: UGM press; 2023. p. 1–208.
- Supriatno. *Oligonukleotid S-phase kinase associated protein-2(SKP) antitense menginduksi hambatan proliferasi dan peningkatan aktivitas apoptosis pada sel kanker dan kepala*. Yogyakarta: UGM; 2007
- Suryadini H (2019) Uji parameter standard dan penapisan fitokimia pada daun steril kalakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F.) Bedd.) menggunakan ekstraksi bertingkat. *J Ilm Farm Farmasyifa* 2: 40–51. doi: 10.29313/jiff.v2i1.3968
- Susiani EF, Guntarti A, Kintoko. 2017. Pengaruh suhu pengeringan terhadap kadar flavonoid total ekstrak etanol daun kumis kucing (*Orthosiphon aristatus* BL. Miq.). *Pharmascientech*. 1(2): 1-8.
- Susianti S, Lesmana R, Salam S, Julaha E, Pratiwi YS, Sylviana N, Goenawan H, Kurniawan A & Supratman U, The effect of nutmeg seed (*M. fragrans*) extracts induces apoptosis in melanoma maligna cell's (B16-F10). *Indones Biomed J*, 13 (2021) 68.
- Susianti S, Lesmana R, Salam S, Julaha E, Pratiwi YS, Sylviana N, Goenawan H, Kurniawan A & Supratman U, The effect of nutmeg seed (*M. fragrans*) extracts induces apoptosis in melanoma maligna cell's (B16-F10). *Indones Biomed J*, 13 (2021) 68.

- Syamsul ES, Hakim YY, Nurhasnawati H (2019) Penetapan kadar flavonoid ekstrak daun kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F.) Bedd.) dengan metode spektrofotometri UV-Vis. *J Ris Kefarmasian Indones* 1: 11–20. doi: 10.33759/jrki.v1i1.46
- Syamsul ES, Hakim YY, Nurhasnawati H. Penetapan kadar flavonoid ekstrak daun kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F.) Bedd) dengan metode spektrofotometri UV-VIS. *Jurnal Riset Kefarmasian Indonesia* 2019 Jan; 1(1): 11–20.
- Syamsul ES, Hakim YY, Nurhasnawati H. Penetapan kadar flavonoid ekstrak daun kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm. F.) Bedd.) dengan metode spektrofotometri UV-VIS. *J Ris Kefarmasian Indones*. 2019; 1(1): 11–20.
- Syarifah, N. 2011. Aktivitas Antibakteri Etanol dari Lima Tanaman terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dengan Metode Mikrodilusi M7-A6CLSI. Tugas Akhir Sarjana Farmasi, Jurusan Farmasi, FMIPA, Universitas Garut. Garut. Hlm. 20, 31-34.
- Szliszka, E.; Kucharska, A.Z.; Sokół-Łętowska, A.; Mertas, A.; Czuba, Z.; Krol, W. Chemical Composition and Anti-Inflammatory Effect of Ethanolic Extract of Brazilian Green Propolis on Activated J774A.1 Macrophages. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* 2013, 2013, 1–13. [CrossRef] [PubMed]
- Szliszka, E.; Sokół-Łętowska, A.; Kucharska, A.Z.; Jaworska, D.; Czuba, Z.; Krol, W. Ethanolic Extract of Polish Propolis: Chemical Composition and TRAIL-R2 Death Receptor Targeting Apoptotic Activity against Prostate Cancer Cells. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* 2013, 2013, 1–12. [CrossRef]
- Takehiro C, Yuzo S, Toshitaka K, Akio U. Experimental production of lingual tumor by Jet Injection of 9,10-dimethyl 1,2-benzanthracene. *Matsumoto Shigaku*. 1983; 9: 174 – 182.
- Tan Y, Sun D, Chen J, Li R, Wang S. Ginsenoside Rb3 alleviates smokeinduced lung injury via the H19/miR-29b-3p/HGMB1/TLR4 signalling pathway. *J Cell Mol Med*. 2021;25(5):2725-9. doi: 10.1111/jcmm.15844
- Tan Y. Cell cycling technology: inovatif discovery for signal transduction research; 2004.
- Thomford, N.E.; Senthebane, D.A.; Rowe, A.; Munro, D.; Seele, P.; Maroyi, A.; Dzobo, K. Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 1578. [CrossRef]

- Tian YZ, Liu YP, Tian SC, Ge SY, Wu YJ, Zhang BL. Antitumor activity of ginsenoside Rd in gastric cancer via up-regulation of Caspase-3 and Caspase-9. *Pharmazie*. 2020;75(4):147-50. doi: 10.1691/ph.2020.9931
- Tsirigotis-Maniecka, M.; Szyk-Warszynska, L.; Michna, A.; Warszyński, P.; Wilk, K.A. Colloidal characteristics and functionality of rationally designed esculin-loaded hydrogel microcapsules. *J. Colloid Interface Sci.* 2018, 530, 444–458. [CrossRef]
- Tyszkka-Czochara, M.; Paśko, P.; Reczyński, W.; Szłósarczyk, M.; Bystrowska, B.; Opoka, W. Zinc and propolis reduces cytotoxicity and proliferation in skin fibroblast cell culture: Total polyphenol content and antioxidant capacity of propolis. *Boil. Trace Element Res.* 2014, 160, 123–131. [CrossRef] [PubMed]
- Ukieyanna, E. 2012. “Aktivitas Antioksidan, Kadar Fenolik, dan Flavonoid Total Tumbuhan Suruhan (*Peperomia pellucida* L. Kunth)”. Skripsi. Bogor: Institut Pertanian Bogor. Hal: 9.
- Ukieyanna E. 2012. Aktivitas Antioksidan Kadar Fenolik dan Flavonoid Total Tumbuhan Suruhan (*Peperomia pellucida* L. Kunth). [Skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Umezawa S, Higurashi T, Komiya Y, Arimoto J, Horita N, Kaneko T, et al. Chemoprevention of colorectal cancer: past, present, and future. *Cancer Sci.* 2019 Okt; 110 (10): 3018– 26.
- Utami, P. 2012. Antibiotik Alami untuk Mengatasi Aneka Penyakit. Penerbit PT. Agro Media Pustaka, Jakarta, Hlm. 1, 7-8.
- Uthia R, Arifin H, Efrianti F (2017) Pengaruh hasil fraksinasi ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum* L.) terhadap aktivitas susunan saraf pusat pada mencit putih jantan. *J Farm Higea* 9: 85–95. doi: 10.52689/higea.v9i1.161
- Vaya, J. & M. Aviram. 2001. Nutritional Antioxidants Mechanisms of Action, Analyses of Activities and Medical Applications. Bentham Science Publisher. 1:99-117
- Veeramuthu D, Raja WRT, Al Dhab NA, Savarimuthu I (2017) Flavonoids: anticancer properties. In: Justino J (Ed.) Flavonoids from biosynthesis to human health. Croatia: InTech pp. 287-304.
- Voigt R. 1994. Buku Pelajaran Teknologi Farmasi. Edisi 5. Diterjemahkan oleh Soendani Noerono S. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. Hal: 577.

- Wahyulianingsih, Selpida, H. dan Abdul, M. 2016. “Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr & Perry)”. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, Vol. 3 (2): 188-193
- Wahyuni, Armadany FI, Widasri M. 2016. Uji aktivitas antibakteri secara *in vitro* ekstrak etanol daun pakis sayur (*Diplazium esculentum* Swartz) pada mencit jantan galur balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhi* ATCC 14028. *Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar*. 4(2): 43-49.
- Wanandi SI, Syahrani RA, Suraduhita A, Yunita E, Louisa M. Andrographolide reverses doxorubicin resistance in human breast cancer stem cells by regulating apoptotic gene expressions. *Indones Biomed J*. 2023; 15(5): 288-96.
- Wang J, Xie S, Yang J, Xiong H, Jia Y, Zhou Y, et al. The long noncoding RNA H19 promotes tamoxifen resistance in breast cancer via autophagy. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):81. Epub 20190724. doi: 10.1186/s13045-019-0747-0.
- WHO (2021) Cancer. <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/cancer> World Health Organization, diakses pada 27 April 2021
- Wong RSY (2011) Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 30: 87. doi: 10.1186/1756-9966-30-87
- WHO, 2013. World Malaria Report. <http://www.who.int/malaria/world-malaria-report-2013/en/>. diakses 6 April 2015.
- Wicaksono BD, Tangkearung E & Sandra F, Brucea javanica leaf extract induced apoptosis in human oral squamous cell carcinoma (HSC2) cells by attenuation of mitochondrial membrane permeability. *Indones Biomed J*, 7 (2015) 107.
- Wicaksono BD, Tangkearung E & Sandra F, Brucea javanica leaf extract induced apoptosis in human oral squamous cell carcinoma (HSC2) cells by attenuation of mitochondrial membrane permeability. *Indones Biomed J*, 7 (2015) 107.
- Wicaksono BD, Tangkearung E, Sandra F. Brucea javanica leaf extract induced apoptosis in human oral squamous cell carcinoma (HSC-2) cells by attenuation of mitochondrial membrane permeability. *Indones Biomed J*. 2015; 7(2): 107-10.
- Widayanti NP, Puspawati NM, Suarsana IN, Asih IARA (2016) Aktivitas antioksidan fraksi n-butanol ekstrak kulit terong belanda (*solanum betaceum* cav.) secara *in vitro* dan identifikasi senyawa golongan

- flavonoidnya. *Cakra Kim (Indonesian E-Journal Appl Chem)* 4(1): 30-38.
- Widiyanto J, Wulandari A, Lukitasari M. 2017. Identifikasi keragaman paku di kawasan wisata Mojosemi Forest Park. Di dalam: *Prosiding Seminar Nasional SIMBIOSIS II*. Madiun, 30 September 2017.
- Wieczynska, A.; Wezgowiec, J.; Wieckiewicz, W.; Czarny, A.; Kulbacka, J.; Nowakowska, D.; Gancarz, R.; Wilk, K.A. Antimicrobial Activity, Cytotoxicity and Total Phenolic Content of Different Extracts of Propolis from the West Pomeranian Region in Poland. *Acta Pol. Pharm.-Drug Res.* 2017, 74, 715–722.
- Wijshake T, Zou Z, Chen B, Zhong L, Xiao G, Xie Y, et al. Tumor suppressor function of Beclin 1 in breast cancer cells requires E-cadherin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118(5):e2020478118. doi: 10.1073/pnas.2020478118
- Wi ęckiewicz, W.; Miernik, M.; Wi ęckiewicz, M.; Morawiec, T. Does Propolis Help to Maintain Oral Health? *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* 2013, 2013, 1–8. [CrossRef] [PubMed]
- Wojtyczka, R.D.; Dziedzic, A.; Idzik, D.; K ępa, M.; Kubina, R.; Kabała-Dzik, A.; Smole ń-Dzirba, J.; Stojko, J.; Sajewicz, M.; W ęsik, T.J. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates to Propolis Extract Alone or in Combination with Antimicrobial Drugs. *Molecules* 2013, 18, 9623–9640. [CrossRef]
- Wong, Rebecca SY. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J.Exp.Clin. Cancer Res.* 2011; 1(30): 87.
- Wong SH, Fang CM, Chuah LH, Leong CO, Ngai SC. E-cadherin: its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2018;121:11-22. doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.11.010
- Wu M, Ding HF, Fisher DE. Apoptosis: molecular mechanism. *Nature.* 2001; 1 – 8.
- Wu SD, Xia F, Lin XM, Duan KL, Wang F, Lu QL, et al. Ginsenoside Rd promotes neurite outgrowth of pc12 cells through MAPK/ERK- and PI3K/AKT-Dependent Pathways. *Int J Mol Sci.* 2016;177. doi: 10.3390/ijms17020177
- Xu J, Qiu F, Duan W, Qu G, Wang N & Yao X, New bioactive constituents from *Eleutherine americana*. *Front Chem China*, 1 (2006) 320.
- Xu J, Qiu F, Duan W, Qu G, Wang N & Yao X, New bioactive constituents from *Eleutherine americana*. *Front Chem China*, 1 (2006) 320.

- Yamazaki, Yoshimitsu and Yasuhiro Kawano. 2011. Inhibitory Effects of Herbal Alkaloids on The Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Nitrit Oxide Production in Lipopolysaccharide Stimulated RAW264 Macrophages. *Chem. Pharm. Bull.* 59(3) 388-391.
- Yang, H.; Dong, Y.; Du, H.; Shi, H.; Peng, Y.; Li, X. Antioxidant Compounds from Propolis Collected in Anhui, China. *Molecules* 2011, 16, 3444–3455. [CrossRef]
- Yanti MN, Rahmawati I, Herdwiani W. Uji aktivitas sitotoksik herba kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F.) Bedd.) terhadap sel kanker hati HEPG2. *Jurnal Bioteknol Biosains Indonesia.* 2021 Des; 8(2): 255–66.
- Yen, C.-H.; Chiu, H.-F.; Wu, C.-H.; Lu, Y.-Y.; Han, Y.-C.; Shen, Y.; Venkatakrisnan, K.; Wang, C.-K. Beneficial efficacy of various propolis extracts and their digestive products by *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. *LWT* 2017, 84, 281–289. [CrossRef]
- Yin Q, Chen H, Ma RH, Zhang YY, Liu MM, Thakur K, et al. Ginsenoside CK induces apoptosis of human cervical cancer HeLa cells by regulating autophagy and endoplasmic reticulum stress. *Food Funct.* 2021;12(12):5301-16. doi: 10.1039/d1fo00348h
- Yosika Y, Moniktia. 2014. *Etnobotani Tumbuhan Obat oleh Masyarakat Suku Dayak Seruyan Kabupaten Seruyan Provinsi Kalimantan Tengah. Tugas Akhir Sarjana Farmasi, Jurusan Farmasi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.* Malang.
- Yotopranoto S. 2013. 'Vektor Malaria', dalam: *Imunologi Malaria* (editor). Yoes Prijatna Dachlan, Agung Dwi Wahyu Widodo, Boerhan Hidayat. Surabaya: RSPTI Universitas Airlangga.
- Yu, X.; Li, Z. MicroRNA expression and its implications for diagnosis and therapy of tongue squamous cell carcinoma. *J. Cell. Mol. Med.* 2015, 20, 10–16. [CrossRef] [PubMed]
- Yuan H, Ma Q, Ye L, Piao G (2016) The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules* 21(5): 559-576.
- Yu H, Yan J, Jiao Y, Fu PP. Photochemical reaction of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) and formation of DNA covalent adducts, *Int. J. Environ Res. Public Health.* 2005; 1(2): 114 – 122.
- Yu HY, Zhang XQ, Li X, Zeng FB, Ruan HL (2013) 2-methoxyjuglone induces apoptosis in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells and exhibits *in vivo* antitumor activity in a H22 mouse hepatocellular carcinoma model. *J Nat Prod* 76: 889–895. doi: 10.1021/np400025b

- Yuniarti A, Sundhani E & Nurulita NA, The potentiation effect of bawangdayak (*Sisyrinchium palmifolium* L.) extract on T47D cell growth inhibition after 5-fluorouracil treatment. *Pharmaciana*, 8 (2018) 195.
- Yuniarti A, Sundhani E & Nurulita NA, The potentiation effect of bawangdayak (*Sisyrinchium palmifolium* L.) extract on T47D cell growth inhibition after 5-fluorouracil treatment. *Pharmaciana*, 8 (2018) 195.
- Yu XX, Li H, Lin DF, Guo WZ, Xu ZH, Wang LP, et al. Ginsenoside prolongs the lifespan of *c. elegans* via lipid metabolism and activating the stress response signaling pathway. *Int J Mol Sci*. 2021;22(18):9668. doi: 10.3390/ijms22189668
- Zali, A.G.; Ehsanzadeh, P.; Szumny, A.; Matkowski, A. Genotype-specific response of *Foeniculum vulgare* grain yield and essential oil composition to proline treatment under different irrigation conditions. *Ind. Crop. Prod.* 2018, 124, 177–185. [CrossRef]
- Zhang Q, Cheng G, Pan J, Zielonka J, Xiong D, Myers CR, et al. Magnolia extract is effective for the chemoprevention of oral cancer through its ability to inhibit mitochondrial respiration at complex i. *Cell Commun Signal*. 2020 Apr; 18(1): 58.
- Zhang Y, Huang W, Yuan Y, Li J, Wu J, Yu J, et al. Long non-coding RNA H19 promotes colorectal cancer metastasis via binding to hnRNPA2B1. *J Exp Clin Cancer Res*. 2020;39(1):141. doi: 10.1186/s13046-020-01619-6
- Zhang YX, Wang L, Xiao EL, Li SJ, Chen JJ, Gao B, et al. Ginsenoside-Rd exhibits anti-inflammatory activities through elevation of antioxidant enzyme activities and inhibition of JNK and ERK activation *in vivo*. *Int Immunopharmacol*. 2013;17(4):1094-100. doi: 10.1016/j.intimp.2013.10.013
- Zhao T, Jiang W, Wang X, Wang H, Zheng C, Li Y, et al. ESE3 inhibits pancreatic cancer metastasis by upregulating E-Cadherin. *Cancer Res*. 2017;77(4):874-85. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2170
- Zhong CJ, Jiang C, Ni SY, Wang QZ, Cheng LG, Wang H, et al. Identification of bioactive anti-angiogenic components targeting tumor endothelial cells in Shenmai injection using multidimensional pharmacokinetics. *Acta Pharmacol Sin B*. 2020;10(9):1694-708. doi: 10.1016/j.apsb.2019.12.011
- Zulkarnain. 2010. *Dasar- Dasar Hortikultura*. Jakarta(ID):Bumi Aksara.

ZZ, Ahmed AS, Gouda YG. 2011. Phytochemical and biological studies of *Adiantum capillus-veneris* L. Saudi pharmaceutical. 19: 65-74.



## Profil Penulis



### **drg. Johni Halim, MKG**

drg. Johni Halim, MKG adalah dosen tetap di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti. Ia menyelesaikan Pendidikan Dokter Gigi S1 pada tahun 2016, dan melanjutkan program profesi yang selesai pada tahun 2018 di Universitas Trisakti. Setelah itu pada tahun 2019 menjadi dosen di FKG Universitas Trisakti serta melanjutkan studi S2 program Magister Kedokteran Gigi di universitas yang sama dan menyelesaikan pada tahun 2021. Sebagai dosen tetap sejak tahun 2022, telah terlibat dalam kegiatan Pendidikan di FKG Universitas Trisakti.



### **drg. Dewi Ranggaini, MKG, FICD**

drg. Dewi Ranggaini, MKG, FICD adalah dosen tetap di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti. Ia menyelesaikan Pendidikan Dokter Gigi S1 pada tahun 1998 dan melanjutkan program profesi yang selesai pada tahun 2000 di Universitas Trisakti. Setelah itu pada tahun 2004 menjadi dosen di FKG Universitas Trisakti serta melanjutkan studi S2 program Magister Kedokteran Gigi di universitas yang sama dan menyelesaikan pada tahun 2018. Sebagai dosen tetap, telah terlibat dalam kegiatan Pendidikan & Pengajaran di FKG Universitas Trisakti.



## Profil Editor



### **drg. Ferry Sandra, PBO, MIPM, PhD**

Penulis meraih gelar dokter gigi dari Universitas Indonesia pada tahun 1996 dan gelar Doctor of Philosophy (Ph.D.) dari Kyushu University pada tahun 2001. Setelah itu, penulis melanjutkan program postdoctoral di Harvard Medical School. Selain itu, penulis juga memperoleh sertifikasi dalam bidang Master of International Project Management (MIPM). Minat riset penulis mencakup berbagai bidang, seperti Biokimia, Biologi Molekuler, Patologi, Stem Cell dan Biologi Kanker serta Pensinyalan Sel.

Saat ini, penulis bertugas sebagai pengajar di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti. Selain itu, penulis juga aktif sebagai Wakil Presiden Asian Cellular Therapy Organization (ACTO); Wakil Ketua Indonesian Association for the Study of Medicinals (IASMED); Senior Advisor Prodia Group serta Senior Editor di 4 jurnal internasional.

Dalam rangka memajukan ilmu biomedis di Indonesia, penulis telah mendirikan 9 pusat penelitian yang menjembatani lingkungan akademik dan industri. Penulis juga telah menjadi keynote speaker di lebih dari 300 seminar, memublikasikan lebih dari 212 artikel ilmiah dan buku, serta membimbing 50 mahasiswa pascasarjana. Publikasi penulis telah memperoleh lebih dari 3666 sitasi dengan H-indeks sebesar 29 pada berbagai jurnal yang diakui secara internasional dan terindeks Web of Science/ Scopus.





# Potensi Ekstrak Alami

dalam Terapi Kanker Lidah

Tanaman herbal telah menjadi salah satu warisan kekayaan alam yang tak ternilai, khususnya dalam pengobatan tradisional. Di tengah pesatnya kemajuan ilmu pengetahuan, potensi ekstrak tanaman sebagai agen antikanker semakin mendapat perhatian serius. Buku ini mengangkat hasil penelitian mendalam tentang berbagai ekstrak tumbuhan yang terbukti memiliki efek sitotoksik pada sel kanker, khususnya kanker lidah.

Berdasarkan kajian ilmiah terhadap ekstrak dari Kelakai, Bawang Dayak, Kulit Manggis, Terung Belanda, hingga Ginsenoside dan Propolis, buku ini memaparkan bagaimana senyawa-senyawa bioaktif dalam tumbuhan dapat menjadi senjata ampuh dalam memerangi perkembangan sel kanker. Melalui pendekatan studi *in vitro* dan *in vivo*, pembaca diajak untuk memahami mekanisme kerja ekstrak tanaman dalam menginduksi apoptosis, menghambat migrasi sel kanker, dan meningkatkan efektivitas terapi kemoterapi konvensional.

Potensi besar dari ekstrak tanaman untuk pengobatan kanker, khususnya kanker lidah, kini hadir di hadapan Anda melalui paparan komprehensif yang inspiratif ini.

ISBN 978-602-6750-61-3



9 786020 750613