

Evaluasi Aktivitas Sitotoksik Dan Indeks Selektivitas Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*) Terhadap Model Sel Kanker Kolon Secara In Vitro

Ichwan Alamsyah Lubis(1), Ramadhan Bestari(2)

Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Sumatera Utara

ichwan.alamsyah@fk.uisu.ac.id(1), ramadhan.bestari@fk.uisu.ac.id(2)

ABSTRAK

Kanker kolon merupakan jenis kanker yang memiliki tingkat insidensi tertinggi ketiga pada pria dan kedua pada wanita. Pengobatan terhadap kanker ini salah satunya adalah kemoterapi. Beberapa jenis obat kemoterapi telah mengalami resistensi, sehingga penting untuk pengembangan obat baru atau pendamping obat yang telah ada. Daun afrika (*Vernonia amygdalina*) memiliki aktivitas sebagai antikanker, namun selektivitas ekstrak ini terhadap sel kanker masih perlu diteliti lebih lanjut. Penelitian ini bertujuan untuk mencari nilai indeks selektivitas (IS) dari ekstrak etil asetat daun afrika (EEADA) melalui perbandingan nilai *half maximal inhibitory concentration* (IC50) dari hasil uji aktivitas sitotoksik dengan metode *Microculture Tetrazolium Technique* (MTT). Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen *in vitro* dengan menggunakan metode *posttest only control group design*. Metode penelitian dimulai dari pembuatan simplisia, pembuatan EEADA menggunakan metode maserasi, uji sitotoksitas EEADA pada sel Vero dan WiDr menggunakan uji MTT, serta penentuan IS dari EEADA. EEADA mempunyai nilai IC50 sebesar 9,07, menunjukkan aktivitas sitotoksik yang sangat kuat terhadap sel WiDr, namun tidak selektif hanya terhadap sel kanker (IS<3).

Kata Kunci : *Vernonia amygdalina*, indeks selektivitas, antikanker, aktivitas sitotoksik

ABSTRACT

Colon cancer is a type of cancer with the third highest incidence rate in men and the second highest in women. One of the treatments for this cancer is chemotherapy. Some chemotherapy drugs have developed resistance, making developing new drugs or adjuvants essential to existing ones. African leaves (*Vernonia amygdalina*) have anticancer activity, but the selectivity of this extract against cancer cells still needs further research. This study aims to determine the selectivity index (SI) of ethyl acetate extract of African leaves (EAAE) by comparing the half-maximal inhibitory concentration (IC50) values obtained from cytotoxic activity tests using the Microculture Tetrazolium Technique (MTT) method. This research is an *in vitro* experimental study using the posttest-only control group design method. The research method began with preparing the simplicia, preparing EAAE using the maceration method, cytotoxicity testing of EAAE on Vero and WiDr cells using the MTT assay, and determining the SI of EAAE. EAAE had an IC50 value of 9,07, indicating extreme cytotoxic activity against WiDr cells, but it was not selective only for cancer cells (SI < 3).

Keywords : *Vernonia amygdalina*, selectivity index, anticancer, cytotoxic activity

I. PENDAHULUAN

1. Latar Belakang

Kanker kolon adalah jenis kanker yang memiliki tingkat insidensi tertinggi ketiga pada pria dan kedua pada wanita, dengan lebih dari 1,9 juta kasus baru dan lebih dari 930.000 kematian di seluruh dunia (Morgan et al., 2023). Angka kejadian kanker kolon menyumbang 6% dari seluruh kasus kanker yang dilaporkan. Indonesia sendiri memiliki angka kematian akibat kanker kolon yang tertinggi di Asia Tenggara, dengan perkiraan 9444 kematian pada tahun 2020 (Natanael et al., 2022). Pengobatan kanker kolon melibatkan prosedur bedah, radioterapi, dan kemoterapi, yang bervariasi berdasarkan tahap perkembangan penyakit. Kemoterapi umumnya diterapkan pada pasien dengan stadium III dan dalam beberapa kasus kanker kolon stadium II setelah operasi dilakukan untuk mengurangi risiko kekambuhan. Bahkan, seringkali kemoterapi menjadi metode pengobatan utama pada kanker kolon yang sudah mencapai stadium lanjut (Benson et al., 2021). Meskipun demikian, beberapa jenis obat kemoterapi telah mengalami resistensi dalam pengobatan kanker kolon (Wang et al., 2022). Oleh karena itu, sangat penting untuk mengembangkan obat-obatan baru yang dapat mengatasi resistensi terhadap kemoterapi atau potensial sebagai obat kemoterapi baik sebagai pengobatan utama maupun tambahan dalam pengobatan kanker kolon (Rejhová et al., 2018). Banyak senyawa alam yang ditemukan dalam tumbuhan diketahui memiliki sifat sitotoksik terhadap sel-sel kanker, salah satunya adalah tumbuhan dalam genus *Vernonia*, yaitu daun Afrika (*Vernonia amygdalina*) yang memiliki potensi sebagai agen kemoterapi (Kaur et al., 2019). Ekstrak dari daun Afrika telah dilaporkan memiliki efek sitotoksik pada beberapa jenis sel kanker kolon dan jenis kanker lainnya (Bestari, 2021). Terutama, ekstrak daun Afrika yang diekstraksi dengan pelarut etil asetat tampaknya memiliki aktivitas sitotoksik yang sangat kuat, dengan nilai IC₅₀ kurang dari 10 µg/mL (Bestari et al., 2017). Salah satu cara untuk mengukur sejauh mana suatu zat uji bersifat selektif terhadap sel kanker adalah dengan menghitung Indeks Selektivitas (IS), yang merupakan rasio antara nilai *half maximal inhibitory concentration* (IC₅₀) sel Vero dan IC₅₀ model sel kanker yang diuji (McGaw et al., 2014). Jika nilai IS lebih besar dari 3, maka menandakan bahwa obat atau ekstrak tersebut memiliki tingkat selektivitas yang tinggi (López-Lázaro, 2015). Pengujian IS sering dilakukan dengan menggunakan sel Vero untuk memahami respon sel normal terhadap berbagai senyawa kimia. Sel Vero adalah jenis sel epitel non-kanker yang diperoleh dari organ ginjal monyet hijau asal Afrika, memiliki karakteristik sebagai sel *monolayer* dengan bentuk yang poligonal dan pipih, bersifat immortal, tidak menyebabkan pembentukan tumor, dan memiliki karakteristik sel fibroblastik. (Ammerman et al., 2008).

2. Perumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah :

Berdasarkan penjelasan latar belakang di atas, penulis ingin meneliti bagaimana aktivitas sitotoksik dari ekstrak etil asetat daun afrika (*Vernonia amygdalina*) (EEADA) dan profil selektivitas ekstrak ini terhadap model sel kanker kolon melalui penentuan nilai IS.

3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk : menentukan nilai IS dari EEADA menggunakan uji sitotoksik dengan metode *Microculture Tetrazolium Technique* (MTT).

4. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui aktivitas antikanker dan profil selektivitas dari EEADA terhadap model sel kanker kolon yang dapat dijadikan referensi

dan peluang penelitian selanjutnya untuk pengembangan obat baru yang lebih aman dan efektif dalam pengobatan kanker.

II. METODE

Tempat dan Waktu

Pengumpulan sampel daun afrika (*Vernonia amygdalina*) dari Kebun Tanaman Obat Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara. Pembuatan EEADA serta larutan stok dilakukan di Laboratorium Farmakognosi, Fakultas Farmasi, Universitas Sumatera Utara. Kultur sel, pengujian aktivitas sitotoksik, serta analisis hasil dilakukan di Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat, dan Keperawatan Universitas Gadjah Mada.

Rancangan Penelitian atau Model.

Penelitian ini merupakan penelitian kuasi eksperimental *in vitro* dengan desain *posttest-only control group*

Bahan dan Peralatan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun Afrika segar, etilasetat hasil destilasi, hepes, iodium, *isopropanol*, kalium iodida, kloroform, *metanol*, natrium hidroksida, natrium sulfat anhidrat, petroleum eter, raksa (II) klorida, serbuk magnesium, serbuk zinkum, sodium hidrogen sulfat, timbal (II) asetat, toluena, air suling, *dimethyl sulfoxide* (DMSO), sel kanker kolon WiDr dan sel Vero yang merupakan koleksi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM, media *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI), media M199, *fetal bovine serum* (FBS) 10% (v/v), penisillin-streptomisin 2% (v/v), dan fungizone (*amphotericin B*) 0,5%, larutan 0,25% *trypsin-EDTA*, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromida) konsentrasi 5 mg/mL, *phosphate buffer saline* (PBS), *sodium dodecyl sulfate* (SDS) dalam *hidrogen chloride* (HCl) 0,01 N. Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas, *autoclave*, blender, *conical tube*, eksikator, *microplate reader*, inkubator CO₂ 5%, *inverted microscope*, mikroskop cahaya yang dilengkapi dengan kamera, krus porselin, *laminar air flow*, mikropipet, *flask*, hemositometer, alat penghitung, neraca kasar, neraca listrik, oven, pengangas air, *rotary evaporator*, sentrifugator, seperangkat alat destilasi, cawan porselen alas rata, krus porselen bertutup, *vortex*, *24-well plate*, *6-well plate*, dan *96-well plate*.

Tahapan Penelitian

Penyiapan Bahan Uji

Sampel bahan uji yang telah dikumpulkan kemudian diidentifikasi oleh *Herbarium Medanense* (MEDA), Universitas Sumatera Utara, Medan. Proses pengeringan daun afrika dilakukan dengan menggunakan lemari pengering pada suhu sekitar 60 °C hingga benar-benar kering menjadi simplisia, kemudian diblender hingga berubah menjadi bentuk bubuk, lalu ditimbang dan disimpan dalam wadah plastik pada suhu kamar.

Pembuatan Ekstrak

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode *macerasi* menggunakan pelarut etilasetat yang telah didestilasi. Awalnya, 1 kilogram simplisia dimasukkan ke dalam sebuah wadah yang gelap, kemudian dimaserasi dengan 7,5 liter pelarut etilasetat. Setelah itu, wadah tersebut ditutup rapat dan dibiarkan selama 5 hari tanpa terkena cahaya, sambil sesekali diaduk. Setelah periode 5 hari berlalu, larutan disaring dan ampasnya dicuci dengan pelarut etilasetat tambahan hingga mencapai volume total 10 liter. Selanjutnya, larutan tersebut dialirkan ke dalam botol yang tertutup rapat dan berwarna gelap, lalu disimpan di tempat yang dingin dan terlindung dari cahaya selama 2 hari. Setelah itu, larutan tersebut disaring kembali dan diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* (Biobase, Cina) hingga menghasilkan ekstrak kental.

III. HASIL PENELITIAN

Pengujian sitotoksik adalah tahap awal yang digunakan untuk mengevaluasi potensi ketoksikan suatu senyawa, dan nilai IC50 merupakan faktor utama dalam parameter ini. Hasil pengukuran absorbansi dari uji sitotoksik yang dilakukan dengan EEADA terhadap sel Vero dapat ditemukan dalam Tabel 1, sementara hasil yang sama pada uji terhadap sel WiDr tercantum dalam Tabel 2.

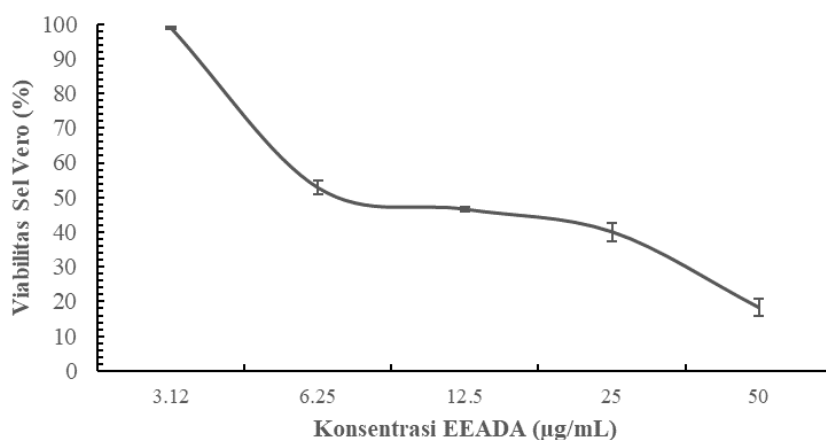
Tabel 1. Nilai Absorbansi Uji Sitotoksik EEADA terhadap Sel Vero

Perlakuan	Absorbansi 1	Absorbansi 2	Absorbansi 3
Kontrol Sel	0.777	0.688	0.705
Kontrol Media	0.076	0.073	0.077
Konsentrasi 50 µg/mL	0.200	0.191	0.190
Konsentrasi 25 µg/mL	0.329	0.337	0.337
Konsentrasi 12.5 µg/mL	0.370	0.362	0.397
Konsentrasi 6.25 µg/mL	0.408	0.419	0.421
Konsentrasi 3.125 µg/mL	0.757	0.685	0.704

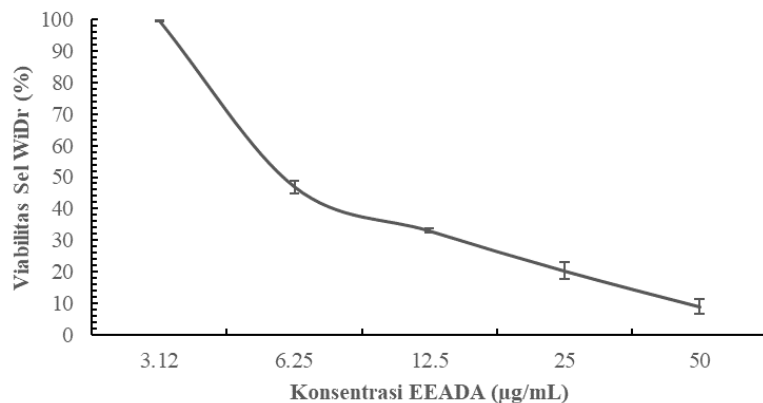
Tabel 2. Nilai Absorbansi Uji Sitotoksik EEADA terhadap Sel WiDr

Perlakuan	Absorbansi 1	Absorbansi 2	Absorbansi 3
Kontrol Sel	0.604	0.585	0.587
Kontrol Media	0.078	0.071	0.064
Konsentrasi 50 µg/mL	0.115	0.113	0.125
Konsentrasi 25 µg/mL	0.170	0.177	0.183
Konsentrasi 12.5 µg/mL	0.250	0.238	0.241
Konsentrasi 6.25 µg/mL	0.313	0.319	0.315
Konsentrasi 3.125 µg/mL	0.602	0.585	0.583

Setelah memperoleh nilai absorbansi, langkah selanjutnya adalah mengubahnya menjadi persentase sel yang masih hidup. Hal ini dilakukan untuk menghitung parameter IC50, yang digunakan untuk menilai tingkat toksisitas suatu senyawa. Pengaruh dari setiap ekstrak terhadap viabilitas sel Vero dan WiDr dapat dilihat pada Gambar 1 dan Gambar 2.



Gambar 1. Grafik Hasil Uji Sitotoksik EEADA terhadap Sel Vero



Gambar 2. Grafik Hasil Uji Sitotoksik EEADA terhadap Sel WiDr.

Aktivitas sitotoksik pada sel Vero dan WiDr dihitung dengan memanfaatkan analisis probit, sehingga diperoleh nilai IC₅₀ untuk masing-masing ekstrak. Selanjutnya, dilakukan perhitungan IS yang merujuk pada parameter selektivitas ekstrak yang menunjukkan kemampuan ekstrak dalam mengaktifkan efek antikanker terhadap sel-sel normal, seperti yang tercatat pada Tabel 3.

Tabel 3. Parameter Nilai IC₅₀ dan IS dari EEADA

Uji Sitotoksik EEADA	IC ₅₀ (µg/mL)	IS
Sel Vero	13,27	1,46
Sel WiDr	9,07	

Untuk mengevaluasi potensi efek sitotoksik dari suatu ekstrak, dapat dilakukan perhitungan nilai IC₅₀ melalui analisis probit (Akçay, 2013). Nilai IC₅₀ EEADA terhadap sel WiDr adalah 9,07, yang dapat diklasifikasikan memiliki aktivitas sitotoksik sangat kuat karena memiliki nilai IC₅₀ kurang dari 10 µg/mL. Daun afrika memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker kolon maupun jenis sel kanker lainnya oleh karena adanya sejumlah senyawa bioaktif utama melalui berbagai jalur mekanisme penghambatan sel kanker yang telah dipelajari (Joseph et al., 2020). Senyawa bioaktif utama yang telah diisolasi dari tanaman ini dapat berasal dari bagian daun, batang, maupun akarnya (Ugbogu et al., 2021). Kemampuan selektivitas dari suatu ekstrak yang menunjukkan aktivitas sitotoksik diukur dengan menghitung nilai IS dengan menghitung pembagian nilai IC₅₀ ekstrak terhadap sel normal dengan nilai IC₅₀ ekstrak terhadap sel kanker (McGaw et al., 2014). Suatu ekstrak diklasifikasikan memiliki selektivitas tinggi terhadap suatu sel kanker apabila nilai IS melebihi 3 (López-Lázaro, 2015). Nilai IC₅₀ EEADA terhadap sel Vero adalah sekitar 13,27 µg/mL, sementara nilai IC₅₀ EEADA terhadap sel WiDr adalah sekitar 9,07 µg/mL, sehingga menghasilkan nilai IS sebesar 1,46. Oleh karena itu, dapat dinyatakan bahwa EEADA yang digunakan dalam penelitian ini kurang selektif terhadap sel kanker WiDr. Tujuan utama dari terapi antikanker saat ini adalah untuk mengeliminasi sel-sel tumor tanpa mengganggu kesehatan secara keseluruhan pada pasien. Namun, dampak negatif yang sering terjadi dari obat kemoterapi adalah pembatasan dosis yang dapat diberikan dengan aman, karena efek samping yang mungkin timbul. Akibatnya, sel-sel kanker masih dapat bertahan, yang pada gilirannya dapat menghasilkan hasil yang kurang memuaskan dalam pengobatan rutin dan perkembangan tumor yang menjadi resisten terhadap obat (Mathijssen et al., 2014). Oleh karena itu, pentingnya selektivitas obat terhadap sel kanker menjadi kunci dalam memastikan keamanan dan efektivitas terapi (Mathijssen et al., 2014). Kita dapat berharap untuk melihat lebih banyak obat kemoterapi

yang efektif yang dirancang untuk menargetkan komponen tertentu, namun, ada risiko bahwa obat-obatan semacam itu dapat memungkinkan sel kanker untuk menghindari penghambatan jalur tertentu karena sifat yang terlalu spesifik dari senyawa tersebut (A Baudino, 2015). Obat-obatan tersebut cenderung memiliki indeks terapi yang sempit dan juga selektivitas yang rendah. Sebagian besar obat antikanker yang ada saat ini, selain menghambat pertumbuhan sel kanker, juga memiliki efek negatif pada sel-sel normal. Terlebih lagi, resistensi terhadap obat antikanker seringkali tidak dapat dihindari, sehingga pengembangan obat antikanker dari sumber alam menjadi sangat penting (Greenwell & Rahman, 2015). Arah penelitian yang banyak dilakukan saat ini bertujuan untuk menemukan senyawa antikanker baru dengan harapan dapat memberikan profil senyawa yang lebih baik dalam hal selektivitas hanya terhadap sel kanker tertentu. Selektivitas suatu obat digunakan sebagai ukuran untuk menilai kebaikan dan keburukan obat tersebut, serta sejauh mana obat tersebut aman (Seca & Pinto, 2018). Semakin sempit indeks selektivitas dari obat antikanker yang saat ini ada, semakin banyak efek samping yang mungkin muncul, yang pada akhirnya dapat membuat pasien kanker menghentikan terapi kemoterapi karena tidak dapat menoleransi efek samping yang ditimbulkan oleh prosedur kemoterapi yang diberikan (Thurston & Pysz, 2021)

IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilaksanakan, maka dapat disimpulkan sebagai berikut : EEADA menunjukkan aktivitas sitotoksik yang sangat kuat terhadap sel WiDr dengan nilai IC₅₀ 9,07 µg/mL µg/mL, dan indeks selektivitas sekitar 1,46. Data ini mengindikasikan bahwa meskipun EEADA memiliki efek sitotoksik yang kuat, namun tidak menunjukkan selektivitas terhadap sel WiDr. Penelitian lanjutan sangat diperlukan untuk mengevaluasi potensi dari EEADA sehingga dapat memberikan profil selektivitas senyawa yang lebih baik dan efektif hanya terhadap sel kanker tertentu.

DAFTAR PUSTAKA

- A Baudino, T. 2015. Targeted cancer therapy: the next generation of cancer treatment. *Current Drug Discovery Technologies*, 12(1), 3–20.
- Akçay, A. 2013. The Calculation of LD₅₀ Using Probit Analysis. *The FASEB Journal*, 27: 1217.28-1217.28.
- Ammerman, N. C., Beier-Sexton, M., dan Azad, A. F. 2008. Growth and maintenance of Vero cell lines. *Current Protocols in Microbiology*, 11(1), A-4E.
- Benson, A. B., Venook, A. P., Al-Hawary, M. M., Arain, M. A., Chen, Y.-J., Ciombor, K. K., Cohen, S., Cooper, H. S., Deming, D., dan Farkas, L. 2021. Colon cancer, version 2.2021, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 19(3), 329–359.
- Bestari, R. 2021. Senyawa Fitokimia dan Aktivitas Farmakologis Daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Del.) sebagai Kandidat Obat Herbal. *Jurnal Kedokteran STM (Sains Dan Teknologi Medik)*, 4(1), 63–74.
- Bestari, R., Ichwan, M., Mustofa, M., dan Satria, D. 2017. Anticancer Activity of *Vernonia amygdalina* Del. Extract on WiDr Colon Cancer Cell Line. *2nd Public Health International Conference (PHICo 2017)*, 172–176.
- Greenwell, M., dan Rahman, P. 2015. Medicinal plants: their use in anticancer treatment. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(10), 4103.
- Joseph, J., Lim, V., Rahman, H. S., Othman, H. H., dan Samad, N. A. 2020. Anti-cancer effects of *Vernonia amygdalina*: A systematic review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 19(8), 1775–1784.

Alamsyah Lubis I, Bestari R : Evaluasi Aktivitas Sitotoksik Dan Indeks Selektivitas Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*) Terhadap Model Sel Kanker Kolon Secara In Vitro

- Kaur, D., Kaur, N., dan Chopra, A. 2019. A comprehensive review on phytochemistry and pharmacological activities of *Vernonia amygdalina*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(3), 2629–2636.
- López-Lázaro, M. 2015. A simple and reliable approach for assessing anticancer activity in vitro. *Current Medicinal Chemistry*, 22(11), 1324–1334.
- Mathijssen, R. H. J., Sparreboom, A., dan Verweij, J. 2014. Determining the optimal dose in the development of anticancer agents. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 11(5), 272–281.
- McGaw, L. J., Elgorashi, E. E., dan Eloff, J. N. 2014. Cytotoxicity of African medicinal plants against normal animal and human cells. dalam *Toxicological survey of African medicinal plants (181–233)*. Elsevier.
- Morgan, E., Arnold, M., Gini, A., Lorenzoni, V., Cabasag, C. J., Laversanne, M., Vignat, J., Ferlay, J., Murphy, N., dan Bray, F. 2023. Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: Incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. *Gut*, 72(2), 338–344.
- Natanael, G., Hardini, N., Lardo, S., dan Suzanna, E. 2022. Associations between Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Histopathological Features of Patients with Adenocarcinoma of Colon in Dharmais National Cancer Hospital, National Cancer Center, Indonesia. *Asian Pacific Journal of Cancer Biology*, 7(1), 37–41.
- Rejhová, A., Opattová, A., Čumová, A., Slíva, D., dan Vodička, P. 2018. Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 144, 582–594.
- Seca, A. M. L., dan Pinto, D. C. G. A. 2018. Plant secondary metabolites as anticancer agents: successes in clinical trials and therapeutic application. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 263.
- Thurston, D. E., dan Pysz, I. 2021. *Chemistry and pharmacology of anticancer drugs*. CRC press.
- Ugbogu, E. A., Emmanuel, O., Dike, E. D., Agi, G. O., Ugbogu, O. C., Ibe, C., & Iweala, E. J. (2021). The phytochemistry, ethnobotanical, and pharmacological potentials of the medicinal plant-*Vernonia amygdalina* L.(bitter Leaf). *Clinical Complementary Medicine and Pharmacology*, 1(1), 100006.
- Wang, Q., Shen, X., Chen, G., & Du, J. (2022). Drug resistance in colorectal cancer: from mechanism to clinic. *Cancers*, 14(12), 2928A
- Baudino, Troy. 2015. Targeted Cancer Therapy: The next Generation of Cancer Treatment. *Current Drug Discovery Technologies* 12(1):3–20.

Accepted Date	Revised Date	Decided Date	Accepted to Publish
24 Agustus 2023	15 September 2023	28 Seotember 2023	Ya