

PIPERANTHA: INOVASI TERAPI KOMBINASI EKSTRAK DAUN SALAM (*EUGENIA POLYANTHA*) DAN SIRIH MERAH (*PIPER CROCATUM*) TERHADAP PENINGKATAN AKTIVITAS FAS/FAS-L PADA REGRESI PERTUMBUHAN KANKER SERVIKS SECARA IN VITRO

Firman Mulyo Wicaksono¹, Desie Suci Permata Sari¹, Beta Herilla Sekti¹, Yitania Sari¹, Ellen Natalia², Diana Lyrawati^{1,3} & Alifia Putri Febriyanti¹

¹ Program Study Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya

email : firmanmulyowicaksono@rocketmail.com

email : desiesucips@hotmail.com

email : betaherilla@rocketmail.com

email : yiethania_tania@yahoo.com

email : diana.l@ub.ac.id

email : alifia.pf@ub.ac.id

² Program Study Gizi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya

email : bless.elle17@gmail.com

³Departemen Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya

email : diana.l@ub.ac.id

Abstract

In this study, we evaluated Eugenia polyantha and Piper crocatum leaves alone and in combination for their anti-cancer properties on HeLa cells. The extraction method by using soxhlet and maceration. The phytochemical constituents of extract were evaluated by qualitative and quantitative analysis. The anti-cancer property and mechanism of the extract were evaluated by its effect on cell viability and apoptosis. Total flavonoids content was higher in maceration than soxhlet extracts. Single extracts of Eugenia polyantha alone or Piper crocatum showed better anti-cancer activity than their combination. However, Eugenia polyantha extracts showed better anti-cancer activity than Piper crocatum extracts.

Keywords : HeLa cell, Eugenia polyantha, Piper crocatum, single, combination

1. PENDAHULUAN

Kanker merupakan pertumbuhan sel-sel abnormal tidak terkontrol (sel neoplasma). Kanker serviks adalah tumbuhnya sel-sel abnormal pada jaringan serviks. Pada tahun 2008 terdapat 529.800 kasus kejadian kanker serviks dan 275.100 diantaranya meninggal dunia, kasus ini akan terus berkembang terutama dinegara berkembang (Cauley, 2012). Indonesia merupakan salah satu negara berkembang dengan tingkat ekonomi rendah dilihat dari nilai Gross National Product (GNP) dan sampai sekarang Indonesia tidak mempunyai badan institusi khusus yang meregulasi kanker serviks (Aziz, 2009).

Berdasarkan penelitian International Agency for Research on Cancer (IARC) 99,7% kanker serviks disebabkan oleh HPV (Clifford et al, 2003). Terapi umum penderita kanker serviks adalah operasi, radioterapi dan

kemoterapi. Salah satu agen kemoterapi yang paling sering digunakan dalam penanganan kanker serviks adalah Cisplatin (Dipiro *et al.*, 2008). Namun, cisplatin juga mempunyai efek samping yang tidak diinginkan seperti neurotoksisitas, toksisitas ginjal atau supresi sumsum tulang belakang (Florea dan Büsselberg, 2011). Hal ini membuat penelitian obat herbal berkembang luas sebagai alternatif terapi yang dianggap lebih efektif dengan efek samping minimal (Agarwal *et al.*, 2013). Saat ini kebiasaan masyarakat Indonesia dalam mengkonsumsi obat herbal sering mengkombinasikan beberapa tanaman tanpa data ilmiah dan bukti klinis yang jelas.

Salam (*Eugenia polyantha*) secara etnomedicine Moi (2005) termasuk satu dari 5 tanaman yang mempunyai aktivitas antitumor yang tinggi. Har (2012) menunjukkan keberadaan asam galat dan

caffeic acid sebagai komponen mayor *phenolic acid* pada ekstrak metanol Salam (*Eugenia polyantha*) dimana kedua zat tersebut mampu menghambat NFκB, mengaktifkan Fas melalui aktivasi mekanisme *Fas ligand (Fas-L)-independent*, menginduksi regulasi protein p53 dan Bax, serta mengaktifkan caspase (Watabe *et al*, 2004). Mekanisme ini didukung dengan aktivitas daun sirih merah yang secara ethnomedicine digunakan sebagai antikanker karena mampu menghambat fosforilasi p44/p42 yang berkaitan dengan pertumbuhan sel dan target yang penting untuk terapi antikanker (Wicaksono *et al*, 2009).

Dengan demikian ekstrak daun salam, daun sirih merah, serta kombinasi keduanya dapat dikembangkan sebagai agen terapi kanker.

2. METODE

Rancangan Kegiatan

Penelitian ini dilakukan dengan studi empiris melalui pendekatan kuantitatif dan semikualitatif secara eksperimental murni menggunakan desain *true experimental in vitro. post-test only, control group design* untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun salam, ekstrak daun sirih merah, dan kombinasi kedua ekstrak terhadap efektifitas terapi.

Ruang Lingkup / Objek

Sampel penelitian yang digunakan adalah sel HeLa CCL-2, *cell line* kanker leher rahim yang di kultur. Sel HeLa CCL-2 diperoleh dari *American Type Culture Collection* (ATCC).

Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Pengujian dan Penelitian Terpadu Universitas Gadjah Mada, Laboratorium Biomedik FKUB ; Biokimia FKUB ; LSIH UB ; Farmasi FKUB Malang.

Prosedur Penelitian

Kultur sel HeLa (CCRC, 2013)

Prosesnya terdiri dari yaitu Penumbuhan sel, Pergantian Media, Pemanenan Sel, Perhitungan Sel dan Sub Kultur sel

Ekstraksi Daun Salam dan Daun Sirih Merah (Handa, 2008)

Maserasi: Mencuci alat;menimbang 100 gram serbuk daun salam dan daun sirih merah; Merendam serbuk dengan etanol 96% 1L selama 6 hari dengan pergantian pelarut sebanyak 3 kali; Melakukan pengadukan 30 menit setiap 24 jam sekali. Hasil dari masing-masing filtrat dicampur pada wadah kaca tertutup 3L kemudian disaring menggunakan kertas saring whatman-42/Flanel; Hasil Ekstraksi dipisahkan ekstrak dengan menggunakan rotary evaporator, Hasil akhir ekstrak di *freeze-dryed* untuk menghilangkan residu air, ekstrak di simpan pada suhu 4⁰C.

Soxhlet : Mencuci alat; Menimbang serbuk daun salam dan daun sirih merah 100 gram dan bungkus dengan kertas saring whatman; Menyiapkan alat soxhlet untuk mengekstraksi ; Memasukkan pelarut etanol 96% dalam labu alas bulat disoxhlet (± 100 ml) ; Memasukkan bahan yang diberi kertas saring ke dalam labu klonsong soxhlet; Menyalakan soxhlet; proses soxhletasi hingga bahan terekstrak sempurna (16 siklus atau 20-25 siklus); Hasil Ekstraksi dikeringkan menggunakan rotary evaporator, Hasil akhir ekstrak di *freeze-dryed* untuk menghilangkan any residual air, ekstrak di simpan pada suhu 4⁰C

Penentuan Kualitatif Fitokimia

No	Fitokimia	Reagen	Perubahan Warna
1	Flavonoid	Ekstrak+NaOH 10%	Hijau Kecoklatan
2	Fenol	Ekstrak+5ml Aquades+5% FeCl3	Hijau Tua
3	Minyak Atsiri	Ekstrak+Sudan III	Orange
4	Alkaloid	Ekstrak+ Reagen Mayer	White Creamy
5	Saponin	Ekstrak + Aquades (dikocok)	Terdapat 2 cm layer
6	Tannin	Ekstrak+Aquades+0,1% FeCl3	Coklat kehijauan

Penetapan Kadar Fenol Total

Penetapan kadar fenol total dalam menggunakan metode kolorimetri assay oleh Slinkard dan Singleton dengan beberapa modifikasi. 50 µL sampel ekstrak dicampur dengan 1 ml H₂O destilasi tabung uji, Setelah tercampur dengan baik; 0,5 mL Folin dan Ciocalteu's reagen fenol ditambahkan ke campuran, Setelah 3 menit ; ditambahkan 2,5 mL larutan Na₂CO₃ 20% (w/v) dan ditambahkan sampai H₂O destilasi sampai volume 10 mL, Reaksi dilakukan di tempat gelap selama 90 menit inkubasi pada suhu ruang setelah absorbansinya diukur pada 735 nm terhadap blank, Prosedur yang sama dilakukan untuk larutan standar gallic acid dan kadar fenol total dihitung menggunakan kurva kalibrasi galic acid, Hasilnya dinyatakan sebagai mg dari Gallic Acid Equivalent/ g ekstrak (Perumal *et al*, 2012).

Penetapan Kadar Flavonoid Total

Pembuatan larutan baku induk:

Diambil 250 mg ekstrak, ditambahkan 20 ml aseton, dan HCl 2 M 3 ml, lalu dihidrolisis di microwave selama 20 detik kekuatan 5 (biasa). Filtrat ditampung pada labu ukur 100 ml, ditambahkan aseton hingga tepat 100 ml. Diambil larutan sebanyak 20 ml, ditampung dalam corong pisah, ditambahkan 20 ml air. Dilakukan ekstraksi kocok 3x @ menit, pertama dengan penambahan 15 ml etil asetat, kedua dan ketiga dengan 10 ml etil asetat. Fase etil asetat dijadikan satu di dalam labu ukur 50 ml, dan ditambahkan etil asetat sampai tepat tanda.

Pembuatan larutan blanko:

Diambil 10,0 ml larutan induk, ditambah dengan larutan asam asetat glasial sampai 25,0 ml dalam labu ukur.

Pembuatan larutan sampel:

Diambil 10,0 ml larutan induk, ditambah dengan 1 ml larutan AlCl₃ 10% dan larutan asam asetat glasial sampai 25,0 ml dalam labu ukur.

Pengukuran: Pengukuran dilakukan segera setelah pembuatan larutan blanko dan larutan sampel dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 425 nm. Lihat perbandingan absorbansinya.

Perhitungan Kadar Flavonoid

Total

$\frac{Abs}{0,25} \times 1,25 = \text{kadar (x) flavonoid total}$

Uji proliferasi sel (CCRC, 2013)

Melakukan kultur sel Hela pada 96-well plate; membuat seri konsentrasi sampel untuk perlakuan; Mengambil *plate* yang telah berisi sel dari incubator; Membuang media sel dengan; Mencuci sel dalam sumuran dengan masing-masing 100µl PBS; Membuang PBS; Memasukkan 100 µl seri konsentrasi sampel ke dalam sumuran dengan replikasi sebanyak 3 kali (triplo); Menginkubasi di dalam inkubator 37°C ± 5% CO₂ (lama inkubasi berbeda-beda, mulai dari 24, 48, dan 72 jam); Membuat stok MTT 5 mg/ml ; Membuang media sel, dicuci dengan PBS sebanyak 1x; Menambahkan reagen 100 µl MTT 0,5 mg/ml ke dalam setiap sumuran, termasuk kontrol media; Menginkubasi sel selama 2-4 jam di dalam inkubator sampai terbentuk kristal formazan yang ungu; Jika formazan telah jelas terbentuk, ditambahkan *stopper* SDS 10% dalam 0,1N HCl; Membungkus *plate* dengan aluminium foil dan inkubasikan pada tempat gelap (suhu ruangan) semalam; Membaca absorbansi masing-masing sumuran dengan ELISA *reader* dengan λ=550-600 nm (595 nm).

Imunositokimia Fas, Caspase-3, NFκB, dan HSP70 (CCRC, 2013)

Melakukan kultur sel Hela pada 96-well plate; Membuat seri konsentrasi sampel, Perlakuan terdiri dari : a. Perlakuan dengan sampel, b. Kontrol sel tanpa antibodi primer (akan menunjukkan warna biru), c. Kontrol sel dengan antibodi primer; Membuang semua MK dari sumuran; Mengisikan PBS masing-masing 500µl ke dalam sumuran; Membuang PBS dari sumuran; Memasukkan sampel ekstrak sebanyak 1000 µl ke dalam sumuran; Memasukkan 1000 µl MK untuk kontrol sel ; Menginkubasi di dalam inkubator CO₂ selama 15 jam (Pekerjaan selanjutnya, tidak perlu di dalam LAF); Membuang semua media dari sumuran; mengisikan PBS 500 µl ke dalam masing-masing sumuran; Membuang PBS dari sumuran; Mengambil *cover slip* menggunakan pinset dengan bantuan ujung

jarum; Memberi label pada masing-masing sumuran; Meneteskan 300 µl metanol dingin, inkubasi 10 menit di dalam *freezer*; metanol secara perlahan; Menambahkan 500 µl PBS pada *cover slip*, diamkan selama 5 menit., ambil dan buang PBS dengan mikropipet 1 ml, lakukan pencucian dengan PBS 2 kali ; Menambahkan 500 µl akuades, diamkan selama 5 menit, buang akuades, lakukan pencucian dengan akuades 2 kali ; Meneteskan larutan hidrogen peroksida (*blocking solution*), diinkubasi selama 10 menit, dibuang larutan dengan mikropipet; Meneteskan *prediluted blocking serum*, inkubasi selama 10 menit, buang larutan ; Meneteskan antibodi monoklonal primer untuk antigen yang ingin diamati (caspase-3, NFκB, dan HSP70); Menambahkan 500 µl PBS, inkubasi selama 5 menit, buang PBS; Meneteskan antibodi sekunder yang dilabel biotin (*biotinylated universal secondary antibody*), inkubasi selama 10 menit; Menambahkan 500 µl PBS, inkubasi selama 5 menit, buang PBS; Meneteskan reagen yang berisi kompleks streptavidin-enzim peroksidase, inkubasi selama 10 menit; Menambahkan 500 µl PBS, inkubasi selama 5 menit, buang PBS; meneteskan larutan substrat kromogen DAB, inkubasi selama 10 menit; Menambahkan 500 µl akuades, kemudian buang kembali; Meneteskan larutan MayeHaematoxylin, inkubasi selama 3 menit; Menambahkan 500 µl akuades, kemudian buang kembali; Mengangkat *cover slip* dengan pinset secara hati-hati, kemudian celupkan dalam xylol; Mencelupkan *cover slip* dalam alkohol. *cover slip* dikeringkan; Meletakkan *cover slip* di atas *object glass*, tetesi dengan lem (*mounting media*); Mengamati ekspresi protein dengan mikroskop cahaya

Uji NBT ROS

Melakukan kultur sel Hela pada 24 well plate; membuat seri konsentrasi sampel ekstrak untuk perlakuan; Memasukkan 100 µl seri konsentrasi sampel ke dalam sumuran dengan replikasi sebanyak 3 kali (triplo); Menginkubasi di dalam inkubator 37°C ± 5% CO₂ selama 24 jam; Mengambil supernatan dari 48 *well plate*; Menambahkan reagen 100 µl NBT ke dalam setiap sumuran, termasuk kontrol media; Menginkubasi sel selama 1 jam di dalam ruangan gelap; Memfiksasi sel

dengan ethanol absolute; Membungkus *plate* dengan kertas atau aluminium foil dan inkubasikan pada tempat gelap (suhu ruangan) selama 15 menit; Ethanol absolut diambil dari 48 *well plate*; Menambahkan larutan KOH dan DMSO hingga terbentuk blue; Membaca absorbansi masing-masing sumuran dengan ELISA *reader* dengan λ=570.

Analisis Data

Hasil pengukuran dianalisa secara statistik dengan menggunakan program SPSS 16,0 for Windows 7 dengan tingkat kebermaknaan 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Uji statistik data menggunakan Rancangan Acak Kelompok Faktorial karena pada penelitian dipengaruhi 4 faktor (> 1faktor) dan data bersifat heterogen. Analisis dilanjutkan dengan uji korelasi untuk melihat apakah ada hubungan antara pemberian ekstrak daun salam, daun sirih merah, dan kombinasi keduanya terhadap kecepatan proliferasi sel HeLa CCL-2, level ROS, dan beberapa ekspresi gene yaitu Fas, Caspase-3, NFκB dan HSP 70.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Hasil

3.1.1 Hasil Uji Kualitatif Komponen

Fitokimia

Tabel 1. Komponen Fotokimia Serbuk Daun Salam dan Sirih Merah

Ser bu k da un	Met ode	alk aloi d	flav onoi d	tan ni n	sap oni n	terp enoi d	fe no l
Sal am	Mas eras i	+	+	+	+	+	+
	Sox hlet	+	+	+	+	+	+
Sir ih Me rah	Mas eras i	+	+	+	+	+	+
	Sox hlet	+	+	+	+	+	+

3.1.2 Hasil Uji Kuantitatif Komponen

Fitokimia

Tabel 2. Total Fenol Ekstrak Daun Salam dan Daun Sirih Merah

Serbuk daun	Metode Ekstraksi	Total Fenol (GAE/gram ekstrak)
Salam	Maserasi	47,706 mg
	Soxhlet	62,465 mg
Sirih Merah	Maserasi	48,775 mg
	Soxhlet	96,470 mg

Total Fenol ekstrak daun sirih merah soxhlet > salam soxhlet > sirih merah maserasi > salam maserasi.

Tabel 3. Total Flavonoid Ekstrak Daun Salam dan Daun Sirih Merah

Serbuk daun	Metode Ekstraksi	Total Flavonoid
Salam	Maserasi	4,615%
	Soxhlet	2,885%
Sirih Merah	Maserasi	6,07%
	Soxhlet	5,205%

Flavonoid total ekstrak daun sirih merah maserasi > sirih merah sokletasi > salam maserasi > salam sokletasi.

3.1.3 Hasil MTT Trial 1

Penghambatan proliferasi sel HeLa sirih merah maserasi > salam maserasi > salam sokletasi > sirih merah sokletasi, dan (5) waktu inkubasi ekstrak terhadap penghambatan proliferasi optimal pada 24jam > 48 jam > 72 jam.

Hasil uji RAK Faktorial yang didapatkan hasil (1) jenis tanaman terhadap proliferasi sel HeLa $p = 0,000$; (2) metode ekstraksi terhadap proliferasi sel HeLa $p=0,000$; (3) waktu inkubasi terhadap proliferasi sel HeLa $p=0,000$; (4) konsentrasi ekstrak terhadap proliferasi sel HeLa $p=0,028$; dan (5) interaksi antara jenis tanaman, metode ekstraksi, waktu inkubasi, dan konsentrasi ekstrak terhadap proliferasi sel Hela $p = 0,000$ ($p < 0,05$).

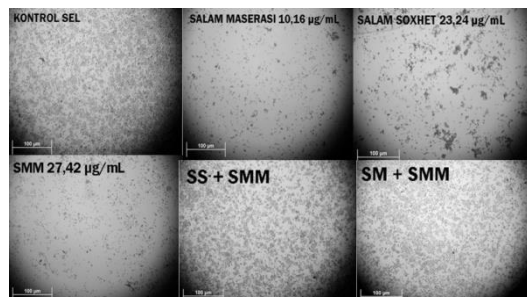
3.1.4 Hasil MTT Trial 2

MTT trial dose II baik salam maserasi, salam soxhlet, dan sirih merah maserasi pada semua dosis yang diujikan mampu menghambat proliferasi sel HeLa, namun standart deviasinya masih tinggi. Oleh karena itu hasil akan di cocokkan dengan penampakan mikroskopis.

Hasil uji RAK Faktorial yang kemudian didapatkan hasil (1) jenis tanaman terhadap proliferasi sel HeLa $p = 0,000$; (2) metode ekstraksi terhadap proliferasi sel

HeLa $p=0,000$; (3) waktu inkubasi terhadap proliferasi sel HeLa $p=0,183$; (4) konsentrasi ekstrak terhadap proliferasi sel HeLa $p=0,015$; dan (5) interaksi antara jenis tanaman, metode ekstraksi, waktu inkubasi, dan konsentrasi ekstrak terhadap proliferasi sel Hela $p = 0,715$.

3.1.5 Hasil MTT Kombinasi



Gambar 6. Penampakan mikroskopis sel HeLa inkubasi 24 jam dengan perlakuan ekstrak tunggal dan ekstrak kombinasi

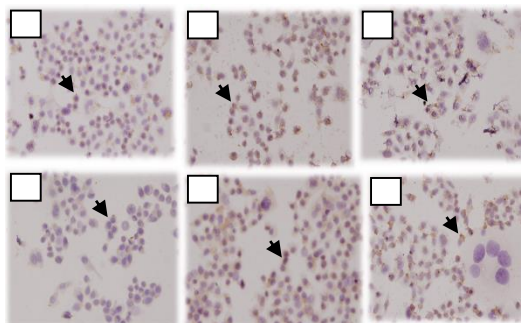
3.1.6 Hasil MTT Cisplatin

Tabel 4. Persentase *viability* sel HeLa menggunakan Cisplatin

Perlakuan	Rata – rata % proliferasi	SD (\pm)
Cisplatin 16µg/mL	38,179	0,288
Cisplatin 8µg/mL	70,548	2,307
Cisplatin 4µg/mL	84,982	2,673
Cisplatin 2µg/mL	96,804	12,284
Cisplatin 1µg/mL	96,981	6,910
Control	100	4,462

3.1.7 Hasil Imunositokimia

3.1.7.1 Hasil Imunositokimia Fas



Gambar 7. Distribusi Fas/CD95

1. Kontrol sel 2. Salam Maserasi (SM) 3. Sirih Merah Maserasi (SMM) 4. Salam Soxhlet (SS) 5. Kombinasi

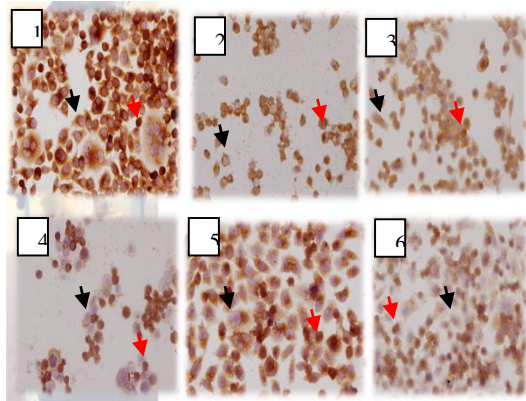
Salam Soxhlet dengan Sirih Merah Maserasi (SS + SMM) 6. Kombinasi Salam Maserasi dengan Sirih Merah Maserasi (SM + SMM) (panah hitam menunjukkan distribusi pada sitoplasma sel HeLa)

Berdasarkan hasil perhitungan sel, distribusi Fas pada membran sel didapatkan rata-rata prosentase pada setiap kelompok adalah sebagai berikut:

Tabel 5. Distribusi Fas/CD95 di Membran Sel HeLa dengan Pemberian Ekstrak

Perlakuan	Rata-rata % Indeks (sel)	Keterangan	SD
kontrol	0,076		± 0,021
SM 10,16 µg/ml	0,06	turun	± 0,001
SM 20,32 µg/ml	0,027	turun	± 0,015
SS 11,62 µg/ml	0,018	turun	± 0,001
SS 23,24 µg/ml	0,025	turun	± 0,035
SMM 13,71 µg/ml	0,009	turun	± 0,006
SMM 27,42 µg/ml	0,012	turun	± 0,017
SM 10,16 µg/ml + SMM 13,71 µg/ml	0,038	turun	± 0,002
SM 20,32 µg/ml + SMM 27,42 µg/ml	0,039	turun	± 0,028
SS 11,62 µg/ml + SMM 13,71 µg/ml	0,012	turun	± 0,007
SS 23,24 µg/ml + SMM 27,42 µg/ml	0,082	turun	± 0,114

1.7.2 Hasil Imunositokimia Caspase-3



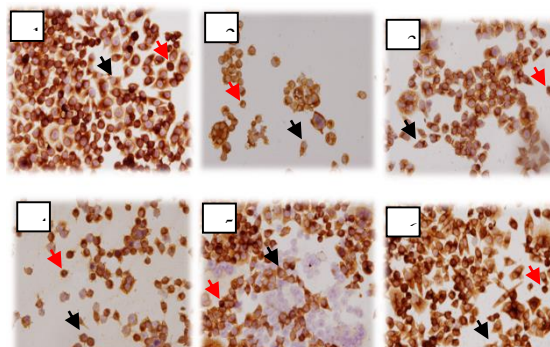
Gambar 9. Distribusi Caspase-3

Tabel 6. Distribusi Caspase-3 di Inti Sel HeLa dengan Pemberian Ekstrak

Perlakuan	Rata-rata % Indeks (sel)	Keterangan	SD	p
kontrol	0,707		± 0,05	p = 0,011 (signifikan)
SM 10,16 µg/ml	0,765	naik	± 0,033	
SM 20,32 µg/ml	0,922	naik	± 0,005	
SS 11,62 µg/ml	0,824	naik	± 0,043	
SS 23,24 µg/ml	0,716	naik	± 0,038	p=0,056 (tidak signifikan)
SMM 13,71 µg/ml	0,687	turun	± 0,012	
SMM 27,42 µg/ml	0,749	naik	± 0,082	
SM 10,16 µg/ml + SMM 13,71 µg/ml	0,489	turun	± 0,038	
SM 20,32 µg/ml + SMM 27,42 µg/ml	tidak ada data	--	--	
SS 11,62 µg/ml + SMM 13,71 µg/ml	0,813	naik	± 0,103	
SS 23,24 µg/ml + SMM 27,42 µg/ml	0,857	naik	± 0,02	

Secara umum ekstrak daun salam, daun sirih merah, dan kombinasi keduanya dapat meningkatkan distribusi caspase-3 di inti sel HeLa.

3.1.7.3 Hasil Imunositokimia NFkB p65



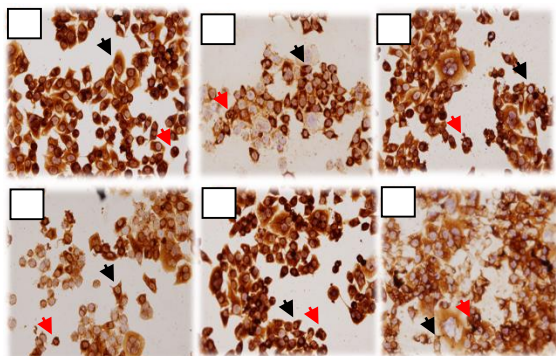
Gambar 9. Distribusi NFkB p65

Tabel 7. Distribusi NFkB p65 di Inti Sel HeLa dengan Pemberian Ekstrak

Perlakuan	Rata-rata % Indeks (sel)	Keterangan	SD	p
kontrol	0,628		± 0,131	p=0,014 (signifikan)
SM 10,16 µg/ml	0,934	naik	± 0,006	
SM 20,32 µg/ml	0,348	turun	± 0,206	
SS 11,62 µg/ml	0,788	naik	± 0,109	
SS 23,24 µg/ml	0,721	naik	± 0,031	
SMM 13,71 µg/ml	0,668	naik	± 0,054	
SMM 27,42 µg/ml	0,612	turun	± 0,189	p=0,214 (tidak Signifikan)
SM 10,16 µg/ml + SMM 13,71 µg/ml	0,788	naik	± 0,101	
SM 20,32 µg/ml + SMM 27,42 µg/ml	tidak ada data	--	--	
SS 11,62 µg/ml + SMM 13,71 µg/ml	0,533	turun	± 0,1	
SS 23,24 µg/ml + SMM 27,42 µg/ml	0,676	naik	± 0,01	

Secara umum ekstrak daun salam, daun sirih merah, dan kombinasi keduanya dapat meningkatkan distribusi NFkB p65 di inti sel HeLa.

3.1.7.4 Hasil Imunositokimia HSP 70



Gambar 10. Distribusi HSP 70

1. Kontrol sel 2. Salam Maserasi (SM) 3. Sirih Merah Maserasi (SMM) 4. Salam Soxhlet (SS) 5. Kombinasi Salam Soxhlet dengan Sirih Merah Maserasi (SS + SMM) 6. Kombinasi Salam Maserasi dengan Sirih Merah Maserasi (SM + SMM) (panah merah menunjukkan distribusi pada inti sel HeLa sedangkan panah hitam menunjukkan distribusi pada sitoplasma sel HeLa)

Tabel 8. Distribusi HSP 70 di Inti Sel HeLa dengan Pemberian Ekstrak

Perlakuan	Rata-rata % Indeks (sel)	Keterangan	SD	p
kontrol	0,968		± 0,045	p=0,494 (tidak Signifikan)
SM 10,16 µg/ml	0,962	Turun	± 0,054	
SM 20,32 µg/ml	0,964	Turun	± 0,021	
SS 11,62 µg/ml	0,638	Turun	± 0,034	
SS 23,24 µg/ml	0,752	Turun	± 0,136	
SMM 13,71 µg/ml	0,879	Turun	± 0,100	
SMM 27,42 µg/ml	0,937	Turun	± 0,089	p=0,136 (tidak Signifikan)
SM 10,16 µg/ml + SMM 13,71 µg/ml	Tidak ada data	-	-	
SM 20,32 µg/ml + SMM 27,42 µg/ml	0,931	Turun	± 0,074	
SS 11,62 µg/ml + SMM 13,71 µg/ml	0,964	Turun	± 0,033	
SS 23,24 µg/ml + SMM 27,42 µg/ml	0,876	Turun	± 0,022	

Secara umum ekstrak daun salam, daun sirih merah, dan kombinasi keduanya menurunkan distribusi HSP70 di inti sel HeLa.

3.1.8 Hasil Uji NBT ROS

Tabel 9. Level ROS Sel HeLa dengan setelah Pemberian Ekstrak

Perlakuan	Rata-rata	Keterangan	SD	p
-----------	-----------	------------	----	---

	Level ROS			
Kontrol	99,83		± 23,43	p=0,101 (tidak Signifikan)
SM 10,16 µg/ml	205,178	Naik	± 89,34	
SM 20,32 µg/ml	204,854	Naik	± 3,50	
SS 11,62 µg/ml	206,796	Naik	± 14,00	
SS 23,24 µg/ml	225,243	Naik	± 36,89	
SMM 13,71 µg/ml	154,693	Naik	± 33,63	
SMM 27,42 µg/ml	237,217	Naik	± 23,27	p=0,708 (tidak Signifikan)
SM 10,16 µg/ml + SMM 13,71 µg/ml	174,434	Naik	± 21,84	
SM 10,16 µg/ml + SMM 27,42 µg/ml	177,670	Naik	± 84,69	
SM 20,32 µg/ml + SMM 13,71 µg/ml	177,023	Naik	± 42,38	
SM 20,32 µg/ml + SMM 27,42 µg/ml	154,693	Naik	± 28,81	
SS 11,62 µg/ml + SMM 13,71 µg/ml	244,013	Naik	± 23,17	
SS 11,62 µg/ml + SMM 27,42 µg/ml	203,560	Naik	± 67,32	
SS 23,24 µg/ml + SMM 13,71 µg/ml	210,680	Naik	± 29,56	
SS 23,24 µg/ml + SMM 27,42 µg/ml	185,761	Naik	± 19,08	

Adanya pengaruh pemberian ekstrak daun salam, daun sirih merah, dan kombinasi keduanya mulai terlihat dimana rata-rata level ROS menjadi lebih tinggi dibandingkan dengan control

3.2 Pembahasan

Pada penelitian ini, daun salam dan daun sirih merah diekstrak menggunakan ethanol 96% menggunakan dua metode ekstraksi dingin (maserasi) dan ekstraksi panas (soxhletasi). Identifikasi ekstrak secara kualitatif terdapat kandungan alkaloid, flavonoid, tannin, saponin, minyak atsiri, dan fenol pada kedua tanaman dan kedua metode ekstraksi. Identifikasi kuantitatif didapatkan perbedaan kadar flavonoid dan polifenol.

Total polifenol terbesar pada ekstrak daun sirih merah metode soxhlet yaitu 96.470 mg GAE/gram ekstrak. Sedangkan pada kandungan flavonoid total terbesar adalah ekstrak daun sirih merah metode maserasi yaitu 6.07%. Kualitas ekstrak dapat ditentukan dengan memilih metode ekstraksi, pelarut, dan beberapa parameter penentu yang tepat, namun sampai saat ini belum ada jaminan bahwa tingginya kandungan fitokimia pada ekstrak berbanding lurus dengan optimalisasi terapi. Optimalisasi terapi pada sel HeLa dapat ditentukan melalui beberapa parameter, diantaranya kemampuan penghambatan proliferasi sel dan induksi apoptosis melalui beberapa peningkatan ekspresi gen (caspase-3, NFkB, dan Fas/CD95), penurunan ekspresi HSP70, dan peningkatan level ROS.

Sel HeLa berproliferasi secara cepat dibandingkan dengan sel kanker lainnya. Sel HeLa yang tumbuh dalam suspensi memiliki doubling time 23 jam (Percell Biolytica) (Fountoulakis *et al*, 2004). Pada uji proliferasi sel HeLa, proliferasi sel secara signifikan dipengaruhi interaksi jenis tanaman, metode ekstraksi, waktu inkubasi, dan konsentrasi ekstrak (p=0,000). Pemaparan sel dengan ekstrak salam maserasi (p=0,041), salam soxhlet (p=0,041), dan sirih merah maserasi (p=0,000) menunjukkan penghambatan yang signifikan terhadap proliferasi sel HeLa kecuali sirih merah soxhlet (p=0,000). Pengujian proliferasi sel dilanjutkan dengan pemaparan kombinasi ekstrak pada 72 variasi kombinasi dosis dan hasilnya baik salam maserasi dengan sirih merah maserasi (p = 0,041) dan salam soxhlet dengan sirih merah maserasi (p= 0,131) mempunyai efek penghambatan proliferasi lebih rendah terhadap proliferasi sel HeLa (0 – 20%) dibandingkan dengan pemberian ekstrak tunggal secara tidak signifikan. Hasil ini sesuai dengan hasil ekspresi HSP70 dalam menentukan proliferasi sel HeLa. HSP70 merupakan suatu protein penting pada fisiologi inflamasi, infeksi, dan perkembangan tumor (Rodriguez *et al*, 2009). Pada jaringan normal dan tidak mengalami stress, HSP70 ditemukan melimpah dimana-mana. Setelah terjadi stress selular (misalnya stress yang diinduksi onkogen), tingkat ekspresi HSP70 meningkat

melalui faktor transkripsi sehingga meningkatkan proliferasi sel. Pada berbagai kanker, pola ekspresi diferensial hilang, diiringi peningkatan ekspresi basal HSP70 (Messey et al, 2009). Hasil uji statistik ekspresi HSP70 menunjukkan adanya pengaruh pemberian ekstrak pada kelompok perlakuan. Hal ini ditunjukkan dengan adanya rata-rata ekspresi HSP70 yang cenderung menurun pada ekstrak salam maserasi, salam soxhlet, dan sirih merah maserasi dibandingkan dengan kontrol, begitu juga dengan kombinasi ekstrak yang menunjukkan penghambatan proliferasi sel HeLa. Jika dibandingkan dengan gold standart cisplatin, potensi penghambatan tidak jauh berbeda, namun pada cisplatin potensi penghambatan berbanding lurus dengan dosis (linear dan stabil), sedangkan pada pemberian ekstrak potensi penghambatan tidak linear (naik turun) karena pada dosis tertentu ekstrak tanaman dapat berperan sebagai prooksidan dan antioksidan, sehingga pada penelitian ini belum ditemukan IC_{50} ekstrak salam maserasi, salam soxhlet, dan sirih merah maserasi. Penelitian ini menggunakan dosis efektif, yakni dosis salam maserasi, salam soxhlet, dan sirih merah maserasi yang mampu menurunkan jumlah sel HeLa secara signifikan.

Selain proliferasi, apoptosis atau kematian sel terprogram sangat penting dalam mengontrol jumlah sel. Apoptosis merupakan mekanisme kematian sel terprogram, mekanisme ini digunakan untuk mengontrol pertumbuhan sel atau merespon kerusakan DNA. Ada dua mekanisme pada sel untuk mati, melalui jalur nekrosis dan jalur apoptosis. Mekanisme nekrosis selalu melalui jalur ekstrinsik, sedangkan mekanisme apoptosis dapat terjadi melalui dua jalur, jalur ekstrinsik dan intrinsik. Mekanisme apoptosis secara eksternal disebut juga apoptosis jalur sitoplasma, mekanisme ini dapat di trigger oleh Fas *death receptor*, Tumor necrosis faktor (TNF) *superfamily*. Sedangkan mekanisme apoptosis secara intrinsik disebut juga apoptosis jalur mitokondria, membutuhkan release sitokrom c yang kemudian mengaktifasi *death signaling pathway*. Mekanisme ekstrinsik dan intrinsik berujung

pada aktivasi *cascade of proteases* yang disebut dengan caspase yang secara langsung menstimulus sel untuk apoptosis (Ghobial et al, 2005).

Pada pengujian jalur apoptosis ekstrinsik digunakan parameter Fas dan NFkB. FAS merupakan anggota dari Tumor Necrosis Factor (TNF) *superfamily*, disebut juga dengan Apo-1 atau CD95 yang berada pada membran sel (Ghobial et al, 2005). Hasil uji statistik ekspresi Fas/CD95 menunjukkan adanya pengaruh pemberian ekstrak pada kelompok perlakuan. Hal ini ditunjukkan dengan adanya rata-rata ekspresi Fas/CD95 di membran sel HeLa yang cenderung menurun pada ekstrak salam maserasi, salam soxhlet, dan sirih merah maserasi ($p=0,380$) dibandingkan dengan kontrol, begitu juga dengan kombinasi ekstrak ($p=0,476$) secara tidak signifikan. Hasil ini dikonfirmasi dengan pengukuran ekspresi NFkB. NFkB merupakan faktor transkripsi pada inti sel yang meregulasi ekspresi dari berbagai gen yang meregulasi apoptosis, replikasi virus, tumorigenesis, inflamasi, dan berbagai macam penyakit autoimun. Hasil uji statistik distribusi NFkB menunjukkan adanya pengaruh pemberian ekstrak pada kelompok perlakuan. Hal ini ditunjukkan dengan adanya rata-rata distribusi NFkB di inti sel HeLa yang cenderung meningkat pada ekstrak salam maserasi, salam soxhlet, dan sirih merah maserasi ($p=0,014$) secara signifikan dibandingkan dengan kontrol, begitu juga dengan kombinasi ekstrak ($p=0,214$) secara tidak signifikan. Sementara itu digunakan ROS untuk pengujian apoptosis intrinsik. Peningkatan ROS memainkan peranan penting pada *release* sitokrom c dari mitokondria. Sitokrom c pada sitoplasma akan mengaktifasi caspase-9 yang kemudian akan menginduksi apoptosis sel kanker (Szeto, 2005). Hasil uji statistik level ROS menunjukkan adanya pengaruh pemberian ekstrak pada kelompok perlakuan. Hal ini ditunjukkan dengan adanya rata-rata level ROS intrinsik sel HeLa yang cenderung meningkat pada ekstrak salam maserasi, salam soxhlet, dan sirih merah maserasi ($p=0,101$) dibandingkan dengan kontrol, begitu juga dengan kombinasi ekstrak ($p=0,708$) secara tidak signifikan. Lalu

dilakukan pengujian ekspresi caspase-3 untuk mengetahui apoptosis final. Caspase-3 merupakan protein dalam inti yang berfungsi mengatur apoptosis sel, apabila caspase teraktivasi maka program kematian sel dimulai dengan penghancuran komponen kunci dari infrastruktur seluler serta pengaktifan faktor-faktor yang memediasi kerusakan sel (Friedlander, 2003). Hasil uji statistik distribusi caspase-3 menunjukkan adanya pengaruh pemberian ekstrak pada kelompok perlakuan. Hal ini ditunjukkan dengan adanya rata-rata distribusi caspase-3 di inti sel HeLa yang cenderung meningkat pada ekstrak salam maserasi, salam soxhlet, dan sirih merah maserasi ($p=0,011$) secara signifikan dibandingkan dengan kontrol, begitu juga dengan kombinasi ekstrak ($p=0,477$) secara tidak signifikan. Sehingga ekstrak salam maserasi, salam soxhlet, salam maserasi, serta kombinasi ekstrak dapat menginduksi apoptosis baik secara ekstrinsik maupun intrinsik walaupun ekstrak tunggal lebih baik dibandingkan ekstrak kombinasi.

4. KESIMPULAN

Pada uji proliferasi dan apoptosis salam maserasi 10,16 $\mu\text{g/ml}$ (76%) menunjukkan potensi antikanker tertinggi dibandingkan salam soxhlet 11,62 $\mu\text{g/ml}$ (63,8%) dan sirih merah maserasi 27,42 $\mu\text{g/ml}$ (60,4%) walaupun memiliki kandungan polifenol dan flavonoid paling rendah, sementara itu sirih merah soxhlet dengan kandungan polifenol dan flavonoid tertinggi tidak memiliki aktifitas antikanker. Hal ini mengindikasikan bahwa tingginya kandungan fitokimia suatu tanaman tidak selalu berbanding lurus dengan aktivitas farmakologinya. Selain itu, pada ekstrak tidak hanya flavonoid dan polifenol yang berperan pada terapi kanker, melainkan seluruh komponen pada ekstrak. Dari data yang diperoleh, ekstrak tunggal menunjukkan aktivitas yang lebih baik dibandingkan ekstrak kombinasi, bahkan ekstrak kombinasi hampir tidak menunjukkan efek farmakologi pada sel HeLa sama sekali. Sehingga dapat disimpulkan pengkombinasian tanaman dengan potensi yang sama belum tentu menghasilkan efek yang lebih baik atau sinergis. Kandungan dalam kedua tanaman bisa jadi saling menghilangkan dan

menghambat potensi masing-masing. Ekstrak daun salam dan sirih merah mampu menurunkan jumlah sel HeLa CCL-2 baik melalui penghambatan proliferasi dan induksi apoptosis secara ekstrinsik maupun intrinsik dengan meningkatkan level ROS, ekspresi caspase-3, ekspresi NF κ B, serta menurunkan ekspresi HSP70.

5. REFERENSI

- Agarwal, C., A. Tyagi dan R. Agarwal. 2006. Gallic Acid Causes Inactivating Phosphorylation Of Cdc25a/Cdc25c-Cdc2 Via ATM-Chk2 Activation, Leading To Cell Cycle Arrest, And Induces Apoptosis In Human Prostate Carcinoma DU145 Cells. *Journal of Mol Cancer Therapy*. 5 (12): 3294 – 3302.
- Agarwal, P., A. Fatima, S. Alok, P.P. Singh, dan A. Verma. 2013. An Update On Disease Profile Of Cancer With Herbal Treatment. *IJPSR*. 4 (6).
- Alfarabi, M. 2010. Kajian Antidiabetogenik Ekstrak Daun Sirih Merah (Piper crocatum) In Vitro. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Aziz, M.F. 2009. 2009. Gynecological cancer in Indonesia. *J Gynecol Oncol*. 20 (1) : 8-10
- Cauley, Dayna L Mc. 2012. *Cervical Cancer*. American Society of Health-System Pharmacists.
- Cancer Cemopreventif Research Center. 2013. *SOP Kultur Sel*. Yogyakarta. Tidak diterbitkan.
- Dipiro, Joseph T., Talbert, Robert L., Yee, Gary C., Matzke, Gary C., Wells, Barbara G., and Posey, L.Michael. 2008. *Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach*. Edisi ke-7. McGraw-Hill. New York. USA.
- Florea, Ana Maria dan Dietrich Büsselberg. 2011. Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *Journal Of Cancers*. 3 : 1351-1371.
- Fountoulakis, M., G. Tsangaris., Ji-eun Oh., A. Maris., and G. Lubec. 2004. Protein profile of the HeLa cell line. *Journal of Chromatography A*. 1038 : 247–265.
- Goldie, S.J., L. Gaffikin, Jeremy D., Amparo G.T., C.I Levin, C. Mahe, dan Thomas C. 2005. Cost-Effectiveness of Cervical-

Cancer Screening in Five Developing Countries. *N Engl J Med.* 353 (21) : 58-68.

- Hadi, S. 2012. Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah (*Piper Crocatum*) Serta Uji Aktivitasnya terhadap Bakteri *Staphylococcus Aureus*. *Skripsi*. Universitas Brawijaya, Malang.
- Har, L.W., Ismail, dan I. Safina. 2012. Antioxidant activity, total phenolics and total flavonoids of *Syzygium polyanthum* (Wight) Walp leaves. *International Journal Medicine Aromatic Plants.* 2 (2): 219 – 228.
- Perumal, S., R. Mahmud, S.P. Piaru, L.W. Cai, S. Ramanathan. 2012. Potential Antiradical Activity and Cytotoxicity Assesment of *Ziziphus mauritiana* and *Syzygium polyanthum*. *International Journal of Pharmacology.* 8 (6): 535-541.
- Watabe, M., K. Hishikawa, A. Takayanagi, N. Shimizu, T. Nakaki. 2003. Caffeic Acid Phenethyl Ester Induces Apoptosis by Inhibition of NFkB and Activation of Fas in Human Breast Cancer MCF-7 Cells. *Journal of Biological Chemistry.* 293 (7).
- Wicaksono, B.D., A.H. Yohana, T.A. Enos, W.K. Irawan, Y. Dian, N.P. Aldrin dan S. Ferry. 2009. Antiproliferative Effect of the Methanol Extract of *Piper crocatum* Ruiz & Pav Leaves on Human Breast (T47D) Cells In-vitro. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* 8 (4): 345 – 352.