



In Vitro Cytotoxic Activity Test of Tampa Badak (*Voacanga foetida* (Blume) Leaves on L1210 Leukemia

Adriani Susanty*, Enda Mora, Emrizal, Armon Fernando, Ibnu Ranu Sabari, Mukhrianur & Ratih kumala Dewi

Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau, Jalan Kamboaja, Simpang Baru, Tampan, Simpang Baru, Kec. Tampan, Kota Pekanbaru, Riau 28289

ABSTRACT: Based on previous research, the ethanolic extract of the *Voacanga foetida* (Blume) Rolfe plant has cytotoxic activity using the Brine Shrimps Lethality test. Therefore, further tested the anticancer activity of extracts, fractions and isolated compounds from *V. foetida* leaves in vitro on L1210 leukemia cells using the direct cell count method with positive control doxorubicin. The results showed that the methanol extract, fraction of butanol fraction, ethyl acetate, and hexane, as well as isolated compounds Tb1 from fraction of hexane, Tb2 from fraction of ethyl acetate, and Tb3 from fraction of butanol leaves from *V. foetida*, had IC₅₀ values of 4,4; 9; 8,4; 16,8; 0,9; 1,8; and 1,1 µg/mL, while doxorubicin has an IC₅₀ value of 0.2 µg/mL. Based on the IC₅₀ value, it showed that the extract, fraction, and isolated compound from *Voacanga foetida* leave had a strong cytotoxic effect as evidenced by the IC₅₀ value < 20 µg/mL (extract and fraction) and < 4 µg/mL (isolate) for each test concentration.

Keywords: *Voacanga foetida*; in vitro; cytotoxic; leukemia cell L1210.

ABSTRAK: Berdasarkan penelitian terdahulu, ekstrak etanol tumbuhan *Voacanga foetida* (Blume) Rolfe memiliki aktivitas sitotoksik dengan uji *Brine Shrimps Lethality*. Oleh karena itu, diuji lebih lanjut aktivitas sitotoksik ekstrak, fraksi dan senyawa isolat dari daun *V. foetida* secara in vitro pada sel leukemia L1210 menggunakan metode penghitungan sel langsung dengan kontrol positif doksorubisin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanol, dan fraksi butanol, fraksi etil asetat, dan fraksi heksan dari *V. foetida* memiliki nilai IC₅₀ yang berturut-turut adalah 4,4; 9; 8,4; 16,8; serta senyawa isolat Tb1 dari fraksi heksan, Tb2 dari fraksi etil asetat dan Tb3 dari fraksi butanol dari *V. foetida* memiliki nilai IC₅₀ yang berturut-turut adalah 0,9; 1,8; dan 1,1 µg/mL, sedangkan doksorubisin memiliki nilai IC₅₀ sebesar 0.2 µg/mL. Berdasarkan nilai IC₅₀ menunjukkan bahwa ekstrak, fraksi dan senyawa isolat dari daun *V. foetida* memiliki efek sitotoksik kuat dibuktikan dengan nilai IC₅₀ < 20 µg/mL (ekstrak dan fraksi) dan < 4 µg/mL (senyawa isolat) untuk setiap konsentrasi uji.

Kata kunci: *Voacanga foetida*; in vitro; sitotoksik; sel leukemia L1210.

Pendahuluan

Sitotoksik merupakan tingkat ketoksikan suatu kandidat obat dan merupakan indikator pengembangan kandidat obat antikanker baru secara in vitro [1]. Penelitian terhadap penemuan obat antikanker baru ditargetkan pada upaya pencarian obat antikanker dengan mekanisme kerja yang spesifik, tujuannya untuk mengurangi efek samping. Salah satu alternatif dalam mencapai tujuan diatas dapat dilakukan dengan cara meneliti aktivitas sitotoksik dari tumbuhan, dan salah satu tumbuhan di Indonesia yang berpotensi sebagai calon obat antikanker baru adalah tumbuhan *Voacanga foetida* (Blume) Rolfe, termasuk famili Apocynaceae. Tumbuhan *V. foetida* mengandung metabolit sekunder alkaloid indole dan bisindole, dimana kedua alkaloid ini diketahui memiliki aktivitas sitotoksik [2].

Tumbuhan *V. foetida* yang dikenal dengan nama Tampa Badak, banyak ditemukan di provinsi Sumatera Barat, Riau, dan Jawa Barat, Jawa Tengah, dan Lombok. Tumbuhan ini telah digunakan sebagai obat tradisional pada kondisi depresi, inflamasi, urtikaria, dermatitis, diare, edema, konvulsi, dan gonore [3]. Infusa dari daun atau kulit batang dari tumbuhan *V. foetida* telah digunakan untuk mengobati luka, gatal, dan inflamasi [4,5]. Daun *V. foetida* yang sudah dihaluskan telah digunakan pada kondisi dermatitis oleh masyarakat di Provinsi Riau, Sumatera, Indonesia [6]. Berdasarkan kajian farmakologi, ekstrak etanol dari daun *V. foetida* memiliki efek analgesik, stimulan, vasodilator, modulator SSP, antimikroba,

Article history

Received: 25 Okt 2021
Accepted: 09 Des 2021
Published: 16 Des 2021

Access this article



*Corresponding Author: Adriani Susanty

Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau, Jalan Kamboaja, Simpang Baru, Tampan, Simpang Baru, Kec. Tampan, Kota Pekanbaru, Riau 28289 | Email: adrianisusanty@stifar-riau.ac.id

antiparasit, antiplasmodial, antiulkus, antiinflamasi, sitotoksik, antitumor, dan antimalaria [7].

Ekstrak etanol daun *V. foetida* memiliki efek analgesik pada dosis 250 mg/kg BB [8], ekstrak etil asetat dari daun *V. foetida* memiliki aktivitas sitotoksik pada sel kanker usus (HTB-38) dengan nilai IC_{50} sebesar 0,1 g/mL [9], senyawa isolat Tb3 dari daun *V. foetida* memiliki efek antiproliferasi pada kanker leukemia (K562), paru (A549) dan serviks (He-La) dengan nilai IC_{50} berturut-turut adalah 0,5; 2,4 dan 3,6 g/mL dibandingkan doksorubisin sebagai kontrol positif dengan nilai IC_{50} 0,2 g/mL [10], dan senyawa hasil isolasi (vobtusin) dari kulit batang tumbuhan *V. foetida* pada dosis 20 μ M dapat menginduksi apoptosis melalui jalur mitokondria dengan cara mengaktivasi caspase-3 dan caspase-9 pada sel kanker leukemia HL-60 pada [2].

Aktivitas antibakteri dari ekstrak alkaloid dan senyawa isolat (lombin) dari tumbuhan *V. foetida* telah dilakukan dengan Metode *Fluorescein Diacetate Assay* [11,12], hasil penelitian menunjukkan bahwa baik ekstrak maupun senyawa isolate dapat menghambat pertumbuhan bakteri pada konsentrasi berturut-turut 5 dan 1.0 mg/mL [12].

Pengujian aktivitas sitotoksik dengan metoda *Brine Shrimps Lethality Test* terhadap ekstrak etanol daun *V. foetida* didapatkan nilai LC_{50} sebesar 84 μ g/mL, hasil ini menunjukkan bahwa tumbuhan ini memiliki aktivitas sitotoksik yang kuat [8]. Pada penelitian sebelumnya, kami telah sudah menguji efek antikarsinogenik dari fraksi butanol daun *V. foetida* menggunakan metode *Micronucleus Assay*, hasil penelitian membunjukan bahwa fraksi butanol dari daun *V. foetida* pada dosis 300 mg/kg BB efektif dalam menghambat karsinogenesis [13]. Penelitian tentang aktivitas farmakologi tumbuhan *V. foetida* sudah banyak dilakukan oleh para peneliti sebelumnya, namun belum ada yang menguji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel kanker leukemia L1210, oleh sebab itu penelitian ini sangat penting untuk dilakukan. Penelitian ini bertujuan

untuk mempelajari aktivitas sitotoksik dari ekstrak, fraksi, dan senyawa isolat daun *V. foetida* secara *in vitro* terhadap sel kanker leukemia L1210.

Metode Penelitian

Alat

Rotary Evaporator, *Analytical Balance* (Kern®), Kertas saring, Spatula, Kulkas -800°C (Thermo type Revo®, ULT 1386), *Haemocytometer* (Neubauer Improved®), *Vial Cryogenic* (Nalgene®), *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC), *Microskop Fluorescent*, *Microplate* 24-sumur (Nunclon®), dan Inkubator CO₂, lampu UV, corong pisah, kertas saring, vial, pelat tetes, tabung reaksi, camber, pinset, *Erlenmeyer*, gelas ukur, spektrometer UV, alat ukur titik lebur (*Fisher-John Melting Point Apparatus*), spektroskopi ¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, DEPT, HMQC, dan HMBC.

Bahan

Daun *V. foetida* diambil dari hutan Lembah Anai di Sumatera Barat, sel leukemia (L1210) diperoleh dari *American Type Culture Collection* (Rockville, MD), RPMI-1640 (Wako, Jepang), 10% (v/v) FBS (Bio -Barat, Jepang), 100 mg/L streptomisin, 100.000 U/L penisilin pada 37°C (Wako, Jepang), 5% CO₂, dan *Trypan Blue* 1% (Invitrogen, Jepang).

Persiapan Ekstrak

Daun kering dimaserasi dengan 2,5 L metanol selama \pm 5 hari, dilakukan triplo. Hasil maserasi kemudian disaring dan filtratnya disimpan dalam botol tertutup, selanjutnya dipekatkan dengan *rotary evaporator*.

Persiapan Fraksinasi

Ekstrak metanol yang diperoleh ditambahkan dengan akuades dan dihomogenkan, kemudian difraksinasi

Tabel 1. Kandungan metabolit sekunder dari tumbuhan *Voacanga foetida* (Blume) Rolfe

No	Sampel	Metabolit Sekunder
1	Ekstrak Metanol	Alkaloid & Steroid/terpenoid
2	Fraksi Butanol	Alkaloid & Steroid/terpenoid
3	Fraksi Etil Asetat	Alkaloid & Steroid/terponoid
4	Fraksi Heksan	Alkaloid & Steroid/terpenoid
5	Senyawa Tb1 (Fraksi Heksan)	Steroid
6	Senyawa Tb2 (EFraksi Etil Asetat)	Steroid
7	Senyawa Tb3 (Fraksi Butanol)	Steroid

Tabel 2. Nilai IC₅₀ ekstrak, fraksi, dan senyawa isolat dari daun tumbuhan *Voacanga foetida* (Blume) Rolfe pada sel leukemia L1210

No.	Sampel	IC ₅₀ (µg/mL)	Kategori Aktivitas Sitotoksik
1	Ekstrak Metanol	4,4	Kuat
2	Fraksi Butanol	9	Kuat
3	Fraksi Etil Asetat	8,4	Kuat
4	Fraksi Heksan	16,8	Kuat
5	Senyawa Tb1 (Fraksi Heksan)	0,9	Kuat
6	Senyawa Tb2 (Fraksi Etil Asetat)	1,8	Kuat
7	Senyawa Tb3 (Fraksi Butanol)	1,1	Kuat
8	Doksorubisin	0,2	Kuat

menggunakan pelarut n-heksana, sehingga diperoleh dua fraksi yaitu n-heksana dan fraksi air. Fraksi air ditambahkan pelarut etil asetat dan fraksinasi. Hasil fraksi etil asetat dan heksana dipisahkan dengan *rotary evaporator*.

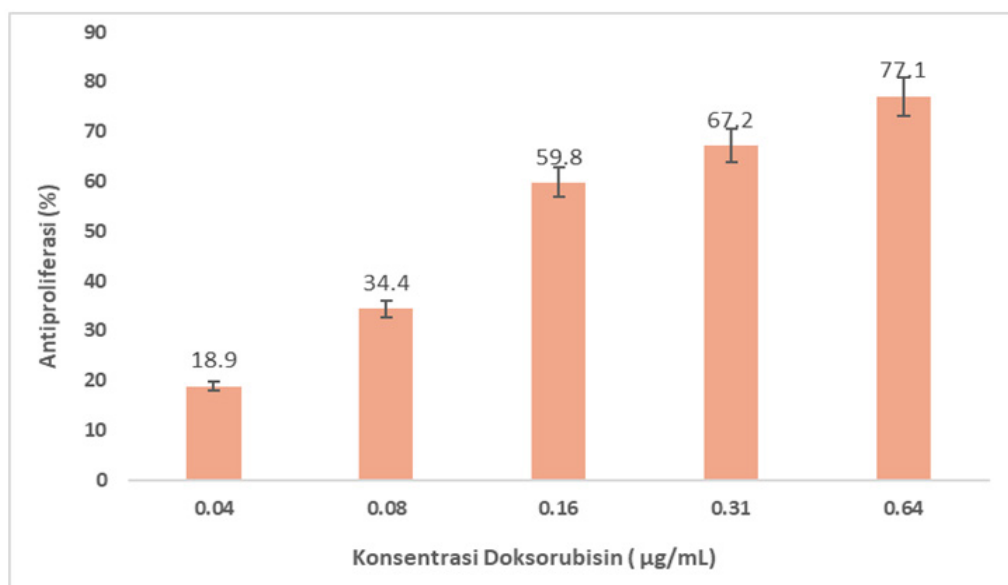
Proses Isolasi Fraksi Heksana, Etil Asetat, dan Butanol [14,15]

Proses isolasi dilakukan dengan metode kromatografi kolom yang dipantau dengan kromatografi lapis tipis. Elusi dimulai dengan menggunakan eluen non-polar (n-heksana), dilanjutkan dengan campuran eluen n-heksana dan etil asetat dengan meningkatkan kepolaran eluen. Hasil kolom ditampung dalam vial dan dipantau dengan KLT di bawah lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm,

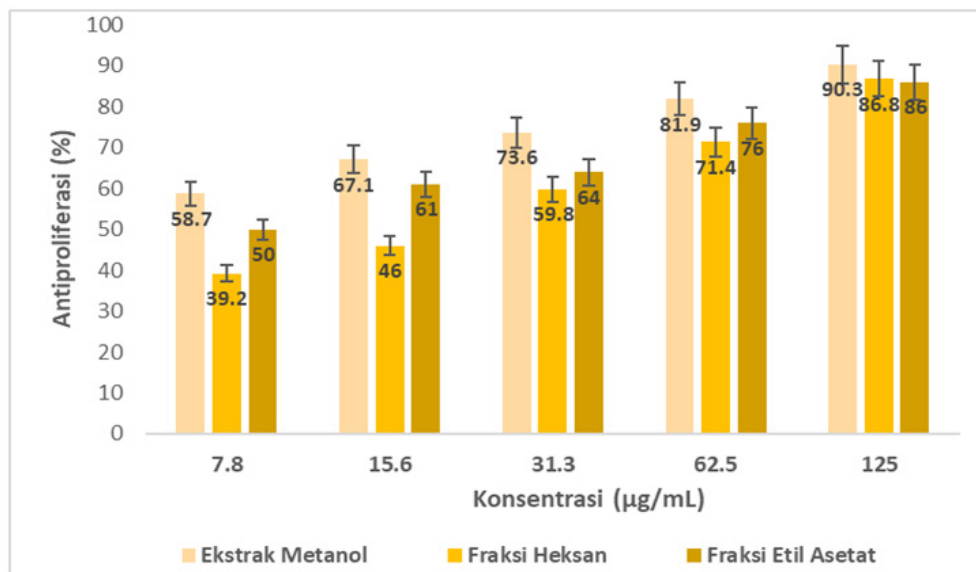
vial dengan noda yang sama digabungkan kemudian dipantau dengan KLT.

Uji Kandungan Metabolit Sekunder [16]

Pemeriksaan alkaloid dilakukan dengan menggunakan metode *Culvenor Fitzgerald*, yaitu: Sebanyak 4 g sampel dihaluskan dan digerus dalam lumpang dengan penambahan pasir bersih, lalu kedalam lumpang ditambahkan 10 mL larutan kloroform, kemudian tambahkan 10 mL larutan kloroform amoniak 0,05 M dan digerus, kemudian disaring kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 10 tetes asam sulfat 2N, dikocok kuat-kuat selama 2 menit, dibiarkan hingga terbentuk dua lapisan dan terjadi pemisahan. Diambil lapisan asam (atas)



Gambar 1. Persentase antiproliferasi doksorubisin (kontrol positif) pada sel L1210



Gambar 2. Persentase antiproliferasi dari ekstrak metanol, fraksi heksan, dan fraksi etil asetat dari daun *V. foetida* pada sel L1210

dan ditambahkan 1-2 tetes pereaksi Mayer. Hasil positif terdapat alkaloid jika terbentuk endapan putih dengan pereaksi Mayer dan menimbulkan warna jingga dengan pemberian reagen Dragendorff.

Pemeriksaan Flavonoid, Fenolik, Saponin, Terpenoid dan Steroid

Sampel sebanyak 0,5 g dan dirajang, kemudian masukkan kedalam tabung reaksi diekstraksi dengan etanol dan dipanaskan selama 15 menit sampai terbentuk ekstrak etanol. Ditambahkan kloroform dan aquadest masing-masing 5 mL (1:1), lalu dikocok kuat dan dibiarkan beberapa saat sampai terbentuk 2 lapisan. Lapisan air (atas) digunakan untuk pemeriksaan flavonoid, fenolik, dan saponin. Lapisan kloroform (bawah) digunakan untuk pemeriksaan terpenoid, dan steroid.

Lapisan air dari hasil pemisahan sebelumnya diteteskan (2-3 tetes) pada 2 lubang plat tetes untuk uji flavonoid dan uji fenolik. Uji flavonoid dilakukan dengan penambahan 1-2 butir logam magnesium dan beberapa tetes HCL pekat pada salah satu lubang plat tetes. Terjadinya perubahan warna jingga, merah muda sampai merah menandakan adanya senyawa flavonoid. Uji fenolik dilakukan dengan penambahan 2 tetes pereaksi $FeCl_3$ 1% pada lubang yang lainnya. Terbentuk warna biru gelap menunjukkan adanya senyawa fenolik.

Pemeriksaan saponin dilakukan dengan cara sebanyak 2 mL lapisan air dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Mulut tabung reaksi ditutup dengan penyumbat karet kemudian dikocok dengan kuat sehingga terbentuk busa. Terbentuknya busa yang tidak segera hilang apabila

didiamkan (15 menit) menunjukkan adanya senyawa saponin.

Pemeriksaan terpenoid dan steroid dilakukan dengan cara lapisan kloroform disaring melalui pipet yang berisi norit. Hasil saringan di pipet sebanyak 2-3 tetes pada 3 lubang plat tetes dan dibiarkan mengering. Pada lubang pertama tambahkan asam sulfat pekat, kemudian pada lubang kedua tambahkan asam asetat anhidrat, dan pada lubang ketiga tambahkan asam asetat anhidrat dan kemudian asam sulfat pekat. Terbentuknya warna merah berarti positif adanya terpenoid dan warna hijau-biru berarti positif adanya steroid.

Karakterisasi Senyawa Murni [17]

Karakterisasi senyawa dilakukan melalui pemeriksaan organoleptis dan pemeriksaan sifat fisika. Pengamatan secara visual, bentuk, warna dan bau dari senyawa murni dilakukan untuk pemeriksaan organoleptis dan penentuan titik leleh untuk pemeriksaan fisika. Penentuan titik leleh dilakukan dengan alat *Fisher-Jhon Melting Point Apparatus* dengan cara meletakkan kristal senyawa murni pada kaca objek, kemudian diletakkan diatas lempeng pemanas di bawah kaca pembesar yang ada pada alat. Kenaikan suhu diamati melalui thermometer yang terhung dengan lempeng pemanas dan kenaikan suhu diatur $1^{\circ}C$ per menit. Titik leleh senyawa dicatat melalui suhu saat senyawa mulai dan sampai semua senyawa meleleh.

Penentuan golongan senyawa kimia dengan mereaksikan senyawa murni dengan reagen atau pereaksi yang telah ditetapkan seperti reagen Mayer dan

Dragendorff untuk menentukan senyawa alkaloid, FeCl_3 untuk menentukan senyawa fenolik, logam Mg tambah HCl untuk flavanoid dan reagen LB untuk menentukan terpenoid dan steroid.

Penentuan Struktur Senyawa Murni

Penentuan struktur senyawa murni hasil isolasi dilakukan dengan menganalisa hasil dari pemeriksaan spektroskopi $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, COSY, HMQC dan HMBC dari senyawa murni.

Pengujian Aktivitas Sitotoksik [18,19]

Pengujian aktivitas dilakukan terhadap sampel uji yang dilarutkan dalam DMSO. Pengujian aktivitas sampel uji dilakukan dengan 5 variasi konsentrasi tertentu. Media yang telah mengandung suspensi sel leukemia L1210 (2×10^5 sel/mL) dimasukkan kedalam *multivell plate tissue's culture* sebanyak 1 mL dalam setiap sumuran. Sebagai kontrol digunakan 10 μL DMSO yang telah ditambahkan 990 mL suspensi sel. Percobaan dilakukan triplo, diinkubasi pada suhu 37°C pada inkubator 5% CO_2 .

Setelah diinkubasi selama 48 jam dilakukan perhitungan jumlah sel yang hidup dengan cara memasukan suspensi sel sebanyak 90 μL kedalam plat dengan 96 sumuran, kemudian ditambahkan larutan *trypan blue* (1%) sebanyak larutan 1% *trypan blue* kemudian dihomogenkan, dan dialirkan ke dalam *Haemocytometer Neubauer Improved*, selanjutnya dilihat dibawah mikroskop untuk membedakan sel yang hidup dengan sel yang mati. Selanjutnya dihitung jumlah sel yang hidup dan dianalisa efek antiproliferasinya

(% inhibisi) menggunakan rumus di bawah ini:

$$\% \text{ inhibisi} = (1 - A/B) 100\%$$

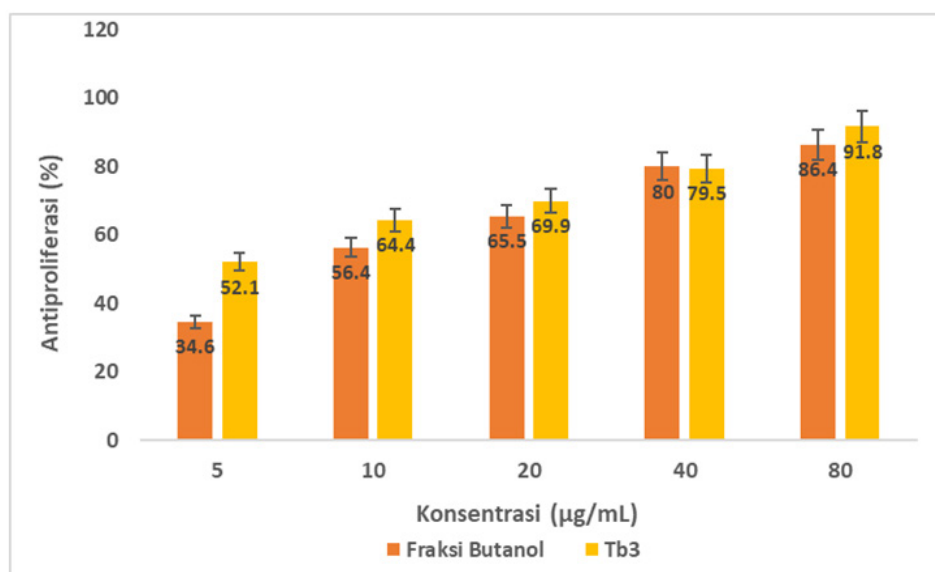
A = Jumlah sel hidup dalam medium yang mengandung zat uji

B = Jumlah sel hidup dalam kontrol negatif

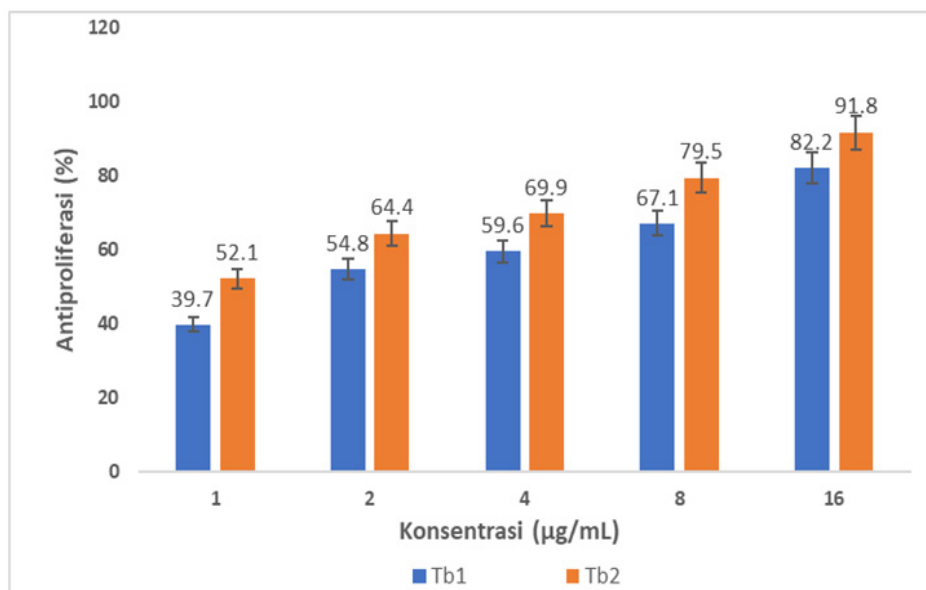
Daya hambat dinyatakan dengan nilai IC_{50} , yaitu konsentrasi senyawa murni dalam $\mu\text{g/mL}$ medium yang dapat menghambat perkembangbiakan sel sebanyak 50% setelah masa inkubasi 48 jam. Ekstrak yang memiliki nilai $\text{IC}_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$ sangat potensial sebagai antikanker dan aktivitas senyawa murni dinyatakan aktif sebagai antikanker bila nilai $\text{IC}_{50} \leq 4 \mu\text{g/mL}$ [20].

Analisa Data

Persen penghambatan yang diperoleh dari masing-masing konsentrasi diubah ke dalam angka probit dengan menggunakan tabel probit. Dari data ini dibuat grafik antara logaritma konsentrasi (x) dan probit (y) sehingga diperoleh persamaan regresi linear $y = a + bx$. IC_{50} diperoleh dengan cara memasukkan nilai $y = 5$ (sebagai probit 50%), maka diperoleh nilai x (log konsentrasi), dengan mengkonversikan nilai logaritma konsentrasi ke bentuk antilogaritma dan hasil tersebut merupakan nilai IC_{50} .



Gambar 3. Persentase antiproliferasi dari fraksi butanol dan senyawa isolat tb3 dari daun *V. foetida* pada sel L1210



Gambar 4. Persentase antiproliferasi dari senyawa isolat tb1 and tb2 dari daun *V. foetida* pada sel L1210

Hasil dan Diskusi

Proses isolasi dan dikarakterisasi dari fraksi heksan, etil asetat, dan butanol dari daun *V. foetida* dengan metode kromatografi kolom didapatkan 3 senyawa yaitu Tb1, Tb2 dan Tb3. Senyawa Tb1 berbentuk amorf putih (28 mg) dengan titik lebur pada 118-119 °C. Senyawa Tb2 berupa kristal kuning (23 mg), dengan titik leleh 123-124 °C dan senyawa Tb3 berupa kristal jarum putih (301 mg) dengan titik leleh 128-130 °C.

Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa Tb₁ (kloroform, frekuensi 500 MHz), senyawa Tb₁ diperkirakan mempunyai 65 atom H yang muncul pada pergeseran kimia (δ_{H}) 5,35; 5,11; 4,67; 4,56; 4,48; 3,70; 3,47; 2,79; 2,36; 2,28; 2,04; 1,67; 1,59; 1,48; 1,24; 1,02; 0,97; 0,93; 0,87; 0,83; 0,78 dan 0,67 ppm. Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ dan DEPT senyawa Tb₁ memiliki 37 atom C yang terdiri dari 6 atom C primer ($-\text{CH}_3$) yaitu pada δ_{C} 28,09; δ_{C} 21,57; δ_{C} 19,47; δ_{C} 18,15; δ_{C} 16,34 dan δ_{C} 14,30 ppm, 16 atom C sekunder ($-\text{CH}_2$) yaitu pada δ_{C} 109,54; δ_{C} 40,14; δ_{C} 39,86; δ_{C} 38,51; δ_{C} 35,71; δ_{C} 34,36; δ_{C} 32,09; δ_{C} 29,87; δ_{C} 29,32; δ_{C} 27,56; δ_{C} 27,35; δ_{C} 25,21; δ_{C} 23,85; δ_{C} 22,87; δ_{C} 21,08 dan δ_{C} 18,35 ppm, 8 atom C tersier ($-\text{CH}$) yaitu pada δ_{C} 128,41; δ_{C} 122,75; δ_{C} 81,10; δ_{C} 55,50; δ_{C} 51,60; δ_{C} 50,46; δ_{C} 48,40 dan δ_{C} 38,16 ppm, 7 atom C quaterner ($-\text{C}$) yaitu pada δ_{C} 174,51; δ_{C} 171,17; δ_{C} 151,08; δ_{C} 43,14; δ_{C} 40,96; δ_{C} 37,93 dan δ_{C} 37,21 ppm.

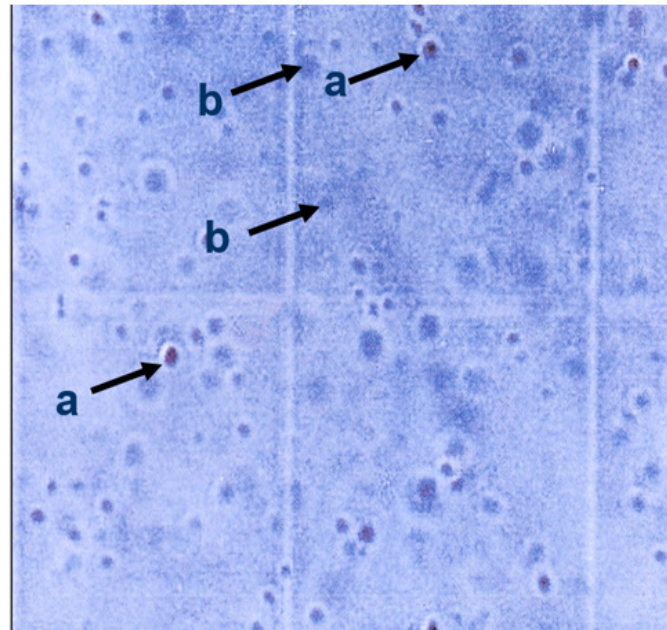
Analisa COSY senyawa Tb₁, terdapat korelasi antara proton pada δ_{H} 5,35 ppm dengan proton δ_{H} 4,56; δ_{H} 2,79 dan δ_{H} 2,04 ppm. Korelasi antara proton pada δ_{H} 5,11 ppm dengan proton δ_{H} 2,04 ppm. Korelasi antara proton

pada δ_{H} 4,56 ppm dengan proton δ_{H} 2,28 dan δ_{H} 1,59 ppm. Korelasi antara proton pada δ_{H} 4,48 ppm dengan proton δ_{H} 1,59 ppm. Korelasi antara proton pada δ_{H} 2,36 ppm dengan proton δ_{H} 1,48 ppm. Korelasi antara proton pada δ_{H} 2,28 ppm dengan proton δ_{H} 1,59 ppm.

Analisa HMQC senyawa Tb₁ memperlihatkan atom H pada δ_{H} 4,67 dan δ_{H} 4,58 ppm melekat dengan atom C pada δ_{C} 109,54 ppm, atom H δ_{H} 4,48 ppm melekat dengan atom C δ_{C} 81,10 ppm, atom H δ_{H} 0,78 ppm melekat dengan atom C δ_{C} 55,50 ppm, atom H δ_{H} 3,67 ppm melekat dengan atom C δ_{C} 51,60 ppm.

Analisa HMBC senyawa Tb₁ memperlihatkan hubungan proton dengan atom karbon tetangga dengan jarak maksimum 4J. Berdasarkan spektrum ini ada korelasi antara δ_{H} 4,67 ppm dengan δ_{C} 48,40 dan δ_{C} 19,47 ppm, korelasi selanjutnya antara δ_{H} 4,56 ppm dengan δ_{C} 48,40 dan δ_{C} 19,47. Korelasi antara δ_{H} 4,48 ppm dengan δ_{C} 171,17; δ_{C} 28,09 dan δ_{C} 16,34 ppm. Korelasi antara δ_{H} 3,67 ppm dengan δ_{C} 174,51 ppm. Korelasi antara δ_{H} 2,79 ppm dengan δ_{C} 128,41 ppm. Korelasi antara δ_{H} 2,28 ppm dengan δ_{C} 174,51; δ_{C} 122,75; δ_{C} 29,87; δ_{C} 29,32 dan δ_{C} 25,21 ppm. Pada artikel ini kami tidak membahas proses isolasi pada fraksi butanol (Tb3) lagi karena sudah pernah dipublikasi sebelumnya [10].

Kandungan metabolit sekunder ekstrak dan fraksi daun *V. foetida* alkaloid dan steroid (Tabel I), dimana kedua metabolit sekunder ini mempunyai aktivitas sitotoksik yang kuat, hal ini mendukung hasil uji aktivitas sitotoksik yang telah dilakukan baik terhadap ekstrak, fraksi maupun senyawa isolat, dimana hasilnya dapat dilihat pada Tabel II



Gambar 5. Sel leukemia L1210 setelah diinkubasi dengan ekstrak *V. foetida* selama 48 jam, 40x. a: sel yang hidup dan b: sel yang mati

dan [Gambar 1-4](#). Jumlah sel yang hidup dihitung di bawah mikroskop. Sel hidup terlihat sebagai lingkaran bening dengan titik biru di tengah lingkaran, sedangkan sel yang mati terlihat sebagai bintik biru tua dengan bentuk tidak beraturan ([Gambar 5](#)).

Nilai IC_{50} dari ekstrak metanol, fraksi butanol, fraksi etil asetat, fraksi heksana dan senyawa isolat Tb1, Tb2, Tb3 berturut-turut adalah 4,4; 9; 8,8; 16,8; 0,9; 1,8 dan 1,1 g/mL; dibandingkan dengan kontrol positif (doksorubisin) dengan nilai IC_{50} sebesar 0,2 g/mL ([Tabel II](#)). Menurut *American National Cancer Institute* (NCI), sediaan ekstrak dan fraksi dikatakan aktif sitotoksik apabila mempunyai nilai $IC_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$ [[21](#)] dan $IC_{50} < 4 \mu\text{g/mL}$ untuk senyawa isolat [[22](#)]. Hasil penelitian ini didukung dengan penelitian kami sebelumnya [[9](#)], yaitu ekstrak etil asetat dari daun *V. foetida* memiliki aktivitas sitotoksik kuat pada sel HTB-38 dengan nilai IC_{50} sebesar 0,1 $\mu\text{g/mL}$. Hasil penelitian ini juga sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Susanty *et al.*, 2020, senyawa isolat Tb3 dari *V. foetida* memiliki efek antiproliferasi pada sel leukemia (K526), kanker paru-paru (A549), dan kanker serviks (He-La) dengan nilai IC_{50} adalah 0,5; 2,4, dan 3,6 g/mL [[10](#)].

Apoptosis atau kematian sel terprogram yang ditandai dengan berbagai perubahan diantaranya: *blebbing* membran sel, kondensasi kromatin, dan pembesaran mitokondria, kerusakan DNA dan fragmentasi DNA [[23](#)]. Susanty *et al.*, 2020 [[2](#)], meneliti bahwa senyawa vobtusine dapat menginduksi apoptosis melalui jalur mitokondria. Mekanisme kerja senyawa vobtusine sebagai

obat antikanker (20 μM) adalah dengan cara menginduksi apoptosis, menyebabkan terjadinya fragmentasi DNA, menghambat siklus sel pada fase sub G1, meningkatkan aktivitas caspase-3 melalui aktivasi caspase -9 pada sel leukemia HL-60 [[7](#)].

Senyawa alkaloid monomer dari tumbuhan *V. foetida* seperti voacangin memiliki aktivitas sitotoksik kuat pada sel kanker HEPG-2, A375, NDA-MB-231, SHSY-5Y, dan CT26 [[24](#)], senyawa voacangin juga bekerja dengan cara memediasi apoptosis pada Tsel HP-1 dan HUVEC [[25](#)]. Menurut Bailly (2020), mekanisme kerja terpenoid sebagai antikanker adalah menghambat siklus sel, menghambat proliferasi sel, menginduksi apoptosis, menghalangi transisi sel epitel ke sel mesenkim, penghambatan migrasi dan invasi sel kanker, dan memodulasi sistem kekebalan PD-L1 [[26](#)].

Hasil penelitian yang kami lakukan juga didukung dengan beberapa penelitian lainnya diantaranya adalah: ekstrak etanol dari daun tumbuhan *V. foetida* efektif dalam menghambat karsinogenesis dan tidak menyebabkan toksisitas pada dosis 200 mg/kg BB [[27](#)]. Alkaloid (VF-1) yang diisolasi dari kulit batang *V. foetida* memiliki aktivitas imunomodulator pada sel Raw 264,7 [[28](#)]. Fraksi DCM dari kulit batang tumbuhan *V. foetida* mempunyai aktivitas sitotoksik yang sangat kuat. Mekanisme kerja antikanker dari senyawa voacangine, vobtusine, dan vobtusine lactone diduga menyebabkan kematian sel dengan menekan aktivitas Bcl-xL dan Mcl-1 dan juga meningkatkan aktivitas Bax dan caspase-3 [[29](#)].

Disarankan kepada peneliti selanjutnya untuk mengisolasi senyawa lain dari tumbuhan *V. foetida* dan melakukan pengujian mekanisme kerja antikankernya; seperti penghambatan siklus sel, induksi apoptosis dan ekspresi gen pro-apoptosis dan pro-survival.

Kesimpulan

Ekstrak dan semua fraksi dari daun tumbuhan *V. foetida* memiliki aktivitas sitotoksik kuat dengan nilai $IC_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$. Senyawa isolat Tb1, Tb2, dan Tb3 juga memiliki aktivitas sitotoksik kuat dengan nilai $IC_{50} < 4 \mu\text{g/mL}$. Tantangan selanjutnya adalah menganalisa mekanisme kerja senyawa isolat sebagai obat kanker. Diharapkan daun *V. foetida* dapat digunakan dan dikembangkan menjadi sediaan fitofarmaka, khususnya pada pengobatan kanker darah (leukemia).

Ucapan Terimakasih

Terima kasih kepada DIPA Kopertis Wilayah X No.023.04.2532476/2014, dan kepada Ketua Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau atas dukungannya pada penelitian ini. Terima kasih kepada PATIR-BATAN yang sudah membantu dalam penelitian ini.

Referensi

- Andersen MEH, Schrama D, Thor SP, and Becker JC. 2006. Cytotoxic T cells. *J. Invest Dermatol*; 126 (1). 32-41. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700001>
- Susanty A, Wahyuni FS, Amelia P, Miyama S, Hirasawa Y, Kaneda T, and Morita H. 2020. Vobtusine from *Voacanga foetida* (Blume) Rolfe Induces Apoptosis via Activation of Caspase Pathway in Human HL-60 Leukemia Cell. *International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology*. 10 (6). 2536–2541. <http://dx.doi.org/10.18517/ijaseit.10.6.12353>
- Valkenburg VJL, and Bunyapraphatsara. 2008. Medicinal and Poisonous Plants. 2. p 584. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.2002.tb01397.x>
- Tizzoni E, Zizzi P, Legnazzi G, Gorini A, Marchetti and Regazzetti A. 1993. Cytotoxic activity of some alkaloids from *Voacanga africana* and *Tabernaemontana elegans*. *Pharmacol Res*. 27 (1). 103-104. <https://doi.org/10.1006/phrs.1993.1086>
- Hussain H, Hussain J, Al-harrasi A, and Green IR. 2012. Chemistry and Biology of the Genus *Voacanga*. *Pharmaceutical Biology*. 50(9), 1183-1193. <https://doi.org/10.3109/13880209.2012.658478>
- Hadi S, Ratnasari DB, Septiyana M, Priyambodo S, and Sudarma IM. 2019. Antibacterial Assay and Alkaloid Lombine Distribution Study of *Voacanga foetida* (Bl.) Rolfe from Lombok Island. *Orient. J. Chem*. <http://dx.doi.org/10.13005/ojc/350133>
- Macabeo AP, Alejandro, GJ, Hallare A, Vidar W, and Villaflores O. 2009. Phytochemical Survey and Pharmacological Activities of the Indole Alkaloids in the Genus *Voacanga* Thouars (Apocynaceae). In *Pharmacognosy Reviews*. <https://www.phcogrev.com/article/2009/3/5-15>
- Susanty A, Fernando A, and Adelin I. 2014. Efek Analgetik Ekstrak Etanol Daun Tumbuhan *Voacanga foetida* (Blume) Rolfe pada Tikus Putih Jantan. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*. <https://doi.org/10.25077/jsfk.1.1.1-9.2014>
- Susanty A, Dachriyanus D, Yanwirasti Y, Wahyuni FS, Fadhli H, and Aswan PA. 2018. Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etil Asetat Daun Tampa Badak (*Voacanga foetida* (Bl.) K.Schum) pada Kanker Kolon HTB-38. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*. <https://doi.org/10.25077/JSFK.5.2.142-146.2018>
- Susanty A, Wahyuni FS, and Sekar AP. 2020. The Anti-proliferation Effect of an Isolated Butanol Fraction of Tampa Badak (*Voacanga foetida* (Bl.) K.Schum) Leaves on Leukemia, Lung, and Cervical Cancer. *Pharmaceutical Science and Research*. 7(3). 171–177. <https://doi.org/10.7454/psr.v7i3.1196>
- Chand S, Lusunzi I, Veal DA, Williams LR, and Caruso P. 1994. Rapid Screening of the Antimicrobial Activity of Extracts and Natural Products. *J. Antibiot*. 47. 1295-1304. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.47.1295>
- Benkendorff K, Davis AR, and Bremner JB. 2001. Chemical Defense in the Egg Masses of Benthic Invertebrates: An Assessment of Antibacterial Activity in 39 Mollusks and 4 Polychaetes. *Journal of Invertebrate Pathology*. 78. 109-118. <https://doi.org/10.1006/jipa.2001.5047>
- Susanty A, Lukam A, dan Chaniago T. 2013. Uji Antikarsinogenik Fraksi Butanol Daun Tampa Badak (*Voacanga foetida* (Blume) Rolfe Menggunakan Metoda Micronucleus Assay. *Jurnal Penelitian Farmasi Indonesia*. 2(1). 14-22. <https://ejournal.stifar-riau.ac.id/index.php/jpfi>
- Silva GOD, Abeyundara AT, and Aponso MMW. 2017. Extraction Methods, Qualitative and Quantitative Technique for Screening of Phytochemicals from Plants. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*. 5(2). 29-32. <https://www.essencejournal.com/pdf/2017/vol5issue2/PartA/5-1-31-91.pdf>
- Saxena M, Saxena J, Nema R, Singh D, and Gupta A. 2013. Phytochemistry of Medicinal Plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 1(6).168-182. <http://dx.doi.org/10.22271/phyto>
- Siddiqui MW, Bansal V, and Prasad K. 2017. Plant Secondary Metabolites Volume 2. Stimulation, Extraction, and Utilization. Apple Academic Press. Canada. <https://doi.org/10.1201/9781315366319>
- Colegate SM, and Molyneux RJ. 2008. Bioactive Natural Product: Detection, Isolation and Structure Determination. Second Edition. Press Taylor & Francis Group. London. <https://doi.org/10.1201/9781420006889>
- Katrin E dan Winarno H. 2008. Aktivitas Sitotoksik Fraksi-Fraksi Etil Asetat Kulit Batang Mahkota Dewa [*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl] Terhadap Sel Kanker Manusia dan Uji Aktivitas Sitotoksik terhadap Sel Leukemia L1210. *J.Traditional Medicines*. vol.13 no.45. 120-127. <http://repo-nkm.batan.go.id/6521/1/SCAN0073.PDF>
- Strober W. 2015. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*. 111: A3.B.1-A3. B.3. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>
- Mans DR, Rocha AB, and Schwartzmann G. 2000. Anticancer Drug Discovery and Development in Brazil: Targeted Plant Collection as a National Strategy to Acquire Candidate Anti-Cancer Compounds. *Oncologist*, 5, 185-198. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.5-3-185>
- WHO. 2018. Cancer. *Cancer World Health Organization (WHO)*. <http://www.who.int/cancer/en/>, accessed on the 1 September 20021.
- Nurestri S, Malek A, Shin SK, Wahab NA, and Yaacob H. 2009. Cytotoxic Components of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) Leaves. *HCT1161713-1724*. <https://doi.org/10.3390/mplocules14051713>
- Kerr JF, Wyllie AH, and Currie AR. 1972. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer*. 26(4). 239-57. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>

- [24]. Chen HM, Yang YT, Li HX, Cao ZX, Dan XM, Mei L, Guo D, Le Song CX, Dai Y, Hu J, and Deng Y. 2016. Cytotoxic Monoterpenoid Indole Alkaloids Isolated from the Bark of *Voacanga Africana* Staph. Natural Product Research. <http://doi.org/10.1080/14786419.2015.1046132>
- [25]. Figueiredo ER, Vieira IJC, De Souza JJ, Braz-Filho R, Mathias L, Kanashiro MM, and Cortes FH. 2010. Isolamento, Identificação e Avaliação da Atividade Antileucêmica de Alcaloides indólicos monoterpênicos de *Tabernaemontana salzmannii*, Apocynaceae. Brazilian Journal of Pharmacognosy. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000100016>
- [26]. Denard B, Lee C, and Ye J. 2012. Doxorubicin Blocks the Proliferation of Cancer Cells Through Proteolytic Activation of CREB3L1. *ELife*, (1), 1–14. <https://doi.org/10.7554/eLife.00090.001>
- [27]. Bailly C. 2020. Anticancer Activities and Mechanism of Action of Nagilactones, a Group of Terpenoid Lactones Isolated from *Podocarpus* Species, Natural Products and Bioprospecting (10), 367–375. <https://doi.org/10.1007/s13659-020-00268-8>
- [28]. Susanty A, Emrizal, Susanti E, Saragih ABR, Muchtar H, Dachriyanus. 2021. In Vivo Cytotoxic Activity and Acute Toxicity Test of Ethanol Extract from *Voacanga foetida* (Blume) Rolfe Leaves, Proceeding the 2nd International Conference on Contemporary Science and Clinical Pharmacy 2021. Published by Atlantis Press International BV. <https://dx.doi.org/10.2991/ahsr.k.211105.003>
- [29]. Azawi Z, Juwita, Susanty A, Putri N, Hefni D, Dachriyanus, Wahyuni FS, 2021. The Immunomodulatory Activities of Alkaloid (VF-1) Isolated from Sterm Bark of Tampa Badak (*Voacanga foetida* (Bl.) Rolfe on Raw 264.7 Cells. Proceedings of the 2nd International Conference on Contemporary Science and Clinical Pharmacy 2021. Published by Atlantis Press International BV. <https://dx.doi.org/10.2991/ahsr.k.211105.039>.



Copyright © 2021 The author(s). You are free to share (copy and redistribute the material in any medium or format) and adapt (remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially) under the following terms: Attribution — You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use; ShareAlike — If you remix, transform, or build upon the material, you must distribute your contributions under the same license as the original (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)