

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Determinasi Tanaman

1. Hasil determinasi tanaman pucuk merah

Determinasi tanaman *Syzygium myrtifolium* Walp. dilakukan di Laboratorium B2P2TOOT Tawangmangu. Identifikasi dilakukan untuk mengetahui apakah tanaman yang digunakan untuk penelitian benar merupakan tanaman *Syzygium myrtifolium* Walp. dan menghindari terjadinya kesalahan pengambilan sampel. Berdasarkan surat keterangan hasil determinasi No. YK.01.03/2/1933/2019 menunjukkan bahwa daun yang digunakan dalam penelitian adalah tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.). Hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran 1.

B. Persiapan Bahan Uji

1. Pengumpulan, pengeringan bahan dan pembuatan serbuk

Daun pucuk merah yang digunakan didapatkan dari daerah Tawangmangu, Karanganyar yang dipetik pada bulan Januari 2019. Daun pucuk merah yang dipilih adalah daun yang berwarna hijau, segar, utuh, dan bebas dari penyakit. Daun segar yang diperoleh seberat 10 kg. Daun pucuk merah yang sudah bersih dimasukkan kedalam oven untuk proses pengeringan, sehingga kadar air dalam daun pucuk merah dapat berkurang untuk mencegah terjadinya perubahan kimia, menghindari pertumbuhan jamur dan bakteri serta untuk memudahkan dalam pengelolaan selanjutnya. Daun kering yang diperoleh sebanyak 2,75 kg. Data rendemen berat daun pucuk merah kering terhadap daun pucuk merah basah dapat dilihat pada tabel 1 dan perhitungan lengkap rendemen daun kering dapat dilihat pada lampiran 4.

Tabel 1. Rendemen berat daun kering terhadap berat daun basah

Berat basah (kg)	Berat kering (kg)	Rendemen (%)	LOD (%)
10	2,75	27,5	72,5

Rendemen adalah persentase hasil yang didapatkan dari membandingkan berat awal bahan dengan berat akhirnya sehingga dapat diketahui berapa bagian tanaman yang masih tersisa setelah proses pengeringan. Penghitungan *Lost Of Drying* (LOD) bertujuan untuk mengukur jumlah air dan semua zat yang mudah menguap setelah proses pengeringan. Setelah pengeringan, daun pucuk merah diserbuk dan ditimbang untuk mengetahui berapa berat serbuk yang didapat. Pada tahap ini, juga dilakukan pemeriksaan secara organoleptis terhadap serbuk daun pucuk merah. Hasil pemeriksaan organoleptis dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil pemeriksaan organoleptis serbuk daun pucuk merah

Organoleptis	Hasil
Bentuk	Serbuk halus
Warna	Hijau kecokelatan
Bau	Khas
Rasa	Pahit sepat

Penyerbukan bertujuan untuk memperkecil ukuran bahan, memperluas permukaan partikel sehingga dapat memaksimalkan proses ekstraksi karena dengan permukaan partikel yang luas dapat meningkatkan kontak antara pelarut dan bahan.

2. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun pucuk merah

Penetapan susut pengeringan daun pucuk merah dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun pucuk merah didapat rata-rata sebesar. Pengukuran susut pengeringan dapat dilihat pada tabel 3. Hasil perhitungan lengkap dapat dilihat pada lampiran

Tabel 3. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun pucuk merah

Replikasi	Berat awal (g)	Berat akhir (g)	Susut pengeringan serbuk (%)
1	2	1,826	8,7
2	2	1,834	8,3
3	2	1,826	8,7
Rata-rata ± SD			8,57 ± 0,231

Susut pengeringan adalah pengukuran sisa zat setelah pengeringan pada suhu 105°C selama 30 menit atau sampai bobot konstan, dan dinyatakan sebagai nilai persen. Penetapan susut pengeringan bertujuan untuk memberikan batasan

maksimal tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan serta untuk mengetahui stabilitas bahan selama penyimpanan untuk mencegah aktivitas mikroba. Nilai susut pengeringan jika tidak dinyatakan lain adalah kurang dari 12% (Depkes RI 2008). Berdasarkan hasil pada tabel 3, nilai rata-rata susut pengeringan simplisia daun pucuk merah adalah sebesar 8,57 % dimana nilai ini memenuhi persyaratan yaitu kurang dari 12%.

3. Pembuatan ekstrak etanol 70% daun pucuk merah

Pembuatan ekstrak etanol daun pucuk merah dilakukan di Laboratorium Fitokimia Universitas Setia Budi. Serbuk daun pucuk merah yang digunakan untuk pembuatan ekstrak etanol sebanyak 500 g. Metode maserasi dipilih sebagai metode pembuatan ekstrak karena mudah dalam penggerjaannya, alat yang digunakan lebih sederhana, dan prosesnya tidak membutuhkan biaya yang mahal. Metode ini cocok digunakan untuk senyawa aktif yang tidak tahan terhadap pemanasan dan biasanya digunakan untuk penyarian simplisia yang mudah larut dalam pelarutnya. Maserasi dibuat dalam wadah kaca gelap untuk menghindari sinar matahari langsung selama proses perendaman.

Pelarut yang digunakan adalah etanol 70% dengan harapan pelarut dapat menarik sebagian besar senyawa aktif dalam simplisia daun pucuk merah. Hal ini dikarenakan pelarut etanol merupakan pelarut universal yang mampu melarutkan zat aktif seperti flavanoid, alkaloid, glikosida, dan steroid (Depkes RI 2008). Selain itu, etanol sebagai penyari lebih selektif dari pada air, dapat mengabsorbsi senyawa aktif dengan baik, dapat bercampur dengan air dan pelarut lain, memperbaiki stabilitas bahan aktif, dan tidak memerlukan suhu tinggi untuk pemekatan (Pratiwi 2010).

Proses maserasi dilakukan dengan cara merendam simplisia dalam keadaan tertutup agar etanol tidak menguap pada suhu kamar. Penguapan pelarut dilakukan dengan menggunakan *rotary evaporator*. Prinsip dari *rotary evaporator* adalah penguapan dengan tekanan sehingga dapat terjadi penguapan dibawah titik didih, suhu yang digunakan saat penguapan adalah 50°C. Penguapan menggunakan suhu yang stabil bertujuan untuk tetap menjaga stabilitas senyawa aktif dari proses pemanasan yang dilakukan dalam jangka waktu yang lama.

Ekstrak kental yang diperoleh ditimbang dan dibandingkan bobotnya dengan simplisia awal yang digunakan. Data rendemen ekstrak dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil rendemen ekstrak etanol daun pucuk merah

Berat serbuk (g)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%)
500	153,95	30,79

Nilai rendemen ekstrak yang dihasilkan adalah 30,79 %. Kualitas ekstrak yang dihasilkan biasanya berbanding terbalik dengan jumlah rendemen yang dihasilkan. Semakin tinggi nilai rendemen yang dihasilkan maka semakin rendah mutu yang didapatkan. Besar kecilnya nilai rendemen menunjukkan keefektifan proses ekstraksi. Efektivitas proses ekstraksi dipengaruhi oleh jenis pelarut yang digunakan sebagai penyari, ukuran partikel simplisia, metode dan lamanya ekstraksi. Hasil pemeriksaan organoleptis ekstrak dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil pemeriksaan organoleptis ekstrak etanol daun pucuk merah

Organoleptis	Hasil
Bentuk	Kental
Warna	Hijau kecoklatan
Bau	Khas
Rasa	Pahit

Pengujian organoleptik dilakukan melalui deskripsi pancaindera yaitu ekstrak etanol daun pucuk merah berbentuk kental yang berwarna hijau kecoklatan dengan bau ekstrak yang khas dan rasanya yang pahit. Hasil ekstraksi berwarna hijau kecoklatan, hal ini karena etanol juga menyari senyawa klorofil yang ada di dalam daun pucuk merah selain zat aktifnya.

4. Hasil penetapan kadar air ekstrak etanol daun pucuk merah

Ekstrak etanol daun pucuk merah dilakukan uji kadar air untuk memberikan gambaran tingkat kelembaban ekstrak yang menentukan stabilitas ekstrak. Kadar air dihitung berdasarkan volume air yang dihasilkan lalu dikalikan massa jenis air dan dibagi dengan berat sampel yang dianalisis (volume/berat). Syarat kadar air adalah kurang dari 10%. Kadar air dalam ekstrak yang kurang dari 10% bertujuan untuk menghindari cepatnya pertumbuhan jamur dalam ekstrak (Depkes RI 2008). Hasil uji kadar air ekstrak dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Hasil penetapan kadar air ekstrak etanol daun pucuk merah

Replikasi	Berat awal (g)	Kadar air (%)
1	10	8
2	10	8
3	10	7
Rata-rata ± SD		7,67 ± 0,577

C. Uji Fitokimia

1. Identifikasi golongan senyawa kimia ekstrak daun pucuk merah secara kualitatif

Identifikasi senyawa dalam ekstrak daun pucuk merah bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung didalamnya dengan melihat adanya perubahan warna, terjadinya buih atau endapan yang ditimbulkan dari masing-masing golongan senyawa. Identifikasi dilakukan dengan menambahkan ekstrak dengan pereaksi yang sesuai dan diamati perubahannya. Hasil identifikasi dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7. Hasil identifikasi kandungan senyawa ekstrak etanol daun pucuk merah

Senyawa	Pereaksi	Hasil identifikasi	Pustaka	Kesimpulan
Flavonoid	Serbuk Mg + HCl pekat	Merah tua	Merah tua (magenta)	+
Alkaloid	Mayer, Wagner,	Endapan putih Coklat kemerahan	Mayer (endapan putih) Wagner (Cokelat kemerahan)	+
Tanin	Dragendorff FeCl ₃ 1%	Jingga Biru kehitaman	Dragendorff (Jingga) Terbentuk warna hijau, biru kehitaman atau hitam kehijauan	+
Saponin	Metode Forth	Busa	Terbentuk buih yang stabil	+
Steroid	Asam anhidrat + H ₂ SO ₄	Hijau kebiruan	Terbentuk warna hijau kebiruan	+
Terpenoid	Asam anhidrat + H ₂ SO ₄	Terbentuk cincin kecokelatan	Terbentuknya cincin kecokelatan pada perbatasan larutan	+

Ket : (+) = positif

(-) = negatif

D. Uji Sitotoksik Ekstrak Daun Pucuk Merah Dengan Metode MTT

Uji sitotoksik dilakukan terhadap kultur sel kanker hati HepG2 di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Uji ini bertujuan untuk mengetahui ketoksikan dari ekstrak etanol daun pucuk merah

terhadap kultur sel kanker hati HepG2 dan selektivitas terhadap sel Vero. Uji sitotoksitas digunakan untuk memperoleh parameter nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa. Metode yang digunakan untuk uji sitotoksik pada penelitian ini adalah metode MTT.

Metode MTT merupakan uji yang sensitif, relatif cepat, akurat, dapat digunakan untuk mengukur sampel dalam jumlah banyak, dan hasilnya bisa untuk memberikan gambaran sifat sitotoksik dari suatu bahan uji. Prinsip uji MTT adalah dengan mengukur aktivitas selular berdasarkan kemampuan enzim reduktase pada mitokondria dalam mereduksi garam methylthiazol tetrazolium (MTT) membentuk kristal formazan berwarna ungu. Kristal formazan bersifat impermeabel pada membran sel dan tidak larut dalam air sehingga perlu penambahan pelarut seperti *Dimethyl Sulfoksida* (DMSO) atau larutan detergen seperti *Sodium Dedocyl Sulphate* (SDS) yang diencerkan dalam asam hidroklorida (HCl) untuk melarutkan kristal formazan (Junedi 2000).

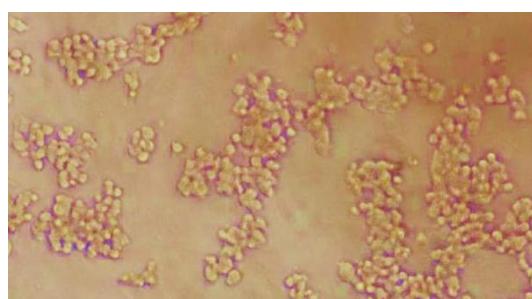
Warna ungu formazan dapat dibaca absorbansinya secara spektrofotometri dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm. Absorbansi menunjukkan jumlah sel hidup. Garam MTT yang berwarna kuning diabsorbsi ke dalam sel hidup kemudian dipecah melalui reaksi reduksi menjadi formazan yang berwarna ungu. Semakin kuat intensitas warna ungu yang terbentuk, maka akan semakin tinggi nilai absorbansinya. Absorbansi inilah yang digunakan untuk menghitung persentase sel hidup (Siregar & Hadijono 2000).

Uji sitotoksitas dilakukan terhadap sel kanker hati HepG2 dan sel Vero. Sel HepG2 dikultur dalam media DMEM dan sel Vero dikultur dalam media M199 yang diinkubasi dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C dalam aliran CO₂ 5 ml/menit. Kultur sel adalah teknik yang biasa digunakan untuk mengembangkan sel di luar tubuh (*in vitro*). Keuntungan kultur sel adalah lingkungan tempat hidup sel dapat dikondisikan semirip mungkin dengan lingkungan di dalam tubuh supaya sel tumbuh dengan baik sehingga kondisi fisiologis dari kultur relatif konstan. Kelemahan teknik ini adalah sel yang dikultur dapat mengalami perubahan sifat karena perkembangbiakan sel di dalam tubuh (*in vivo*) bekerja

secara terintegrasi dalam suatu jaringan, sedangkan dalam kultur sel terpisah-pisah (Zairisman 2006).

Media DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) mengandung konsentrasi asam amino yang tinggi, vitamin, serta glukosa. Media ini cocok digunakan untuk sel dengan kecepatan pertumbuhan yang cepat seperti sel HepG2. Media ini mengandung FBS 10 % sebagai sumber nutrisi bagi sel, Penisillin-Streptomisin 1% sebagai antibakteri, dan Fungizon (Amphotericin B) sebagai anti jamur. Kondisi yang harus diperhatikan dalam medium antara lain tersedianya nutrisi, pH, osmolalitas, volume dan pergantian medium, suhu inkubasi, dan komposisi gas (Doyle dan Griffith 2000).

Preparasi sel dilakukan dengan menumbuhkan sel kanker HepG2 dalam media DMEM sampai jumlah sel yang telah konfluen terlihat menempel rapat di dasar *plate*. Pemanenan sel HepG2 dilakukan dengan membuang media kultur sel, kemudian ditambahkan dengan 5 ml PBS (*Phospot Buffer Saline*) sebanyak dua kali untuk mencuci sel dari sisa media yang masih menempel pada *plate*. Sel yang sudah dicuci kemudian ditambahkan tripsin 0,1 % sebanyak 2 ml. untuk melepaskan sel yang menempel pada dasar plate. Morfologi sel HepG2 yang lepas dari dasar plate akan terlihat berbentuk bulat memanjang (Gambar 6).



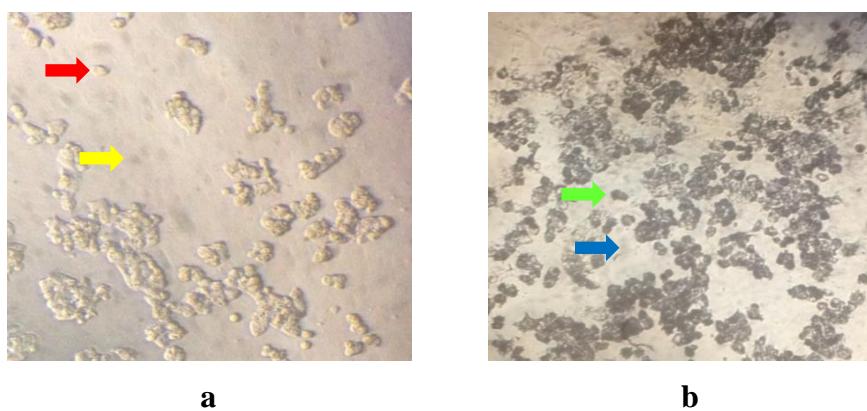
Gambar 6. Morfologi sel HepG2 setelah pemberian tripsin

Pencucian sel dengan PBS berfungsi untuk menghilangkan serum dalam media yang masih tertinggal, karena serum ini dapat menghambat kerja tripsin. Pemberian tripsin bertujuan untuk melepaskan ikatan antara permukaan *tissue culture flask* dengan sel sehingga sel tidak lagi melekat pada permukaan *plate* (Freshney 2004).

Jumlah sel kanker HepG2 yang hidup dalam suspensi stok adalah 50×10^4 sel/3000 μl yang dihitung pada hemositometer. Kemudian dilakukan pengenceran

suspensi untuk mendapatkan konsentrasi sel HepG2 sebesar 10×10^4 sel/ml dan ditambahkan media hingga 10 ml agar cukup untuk satu *plate* 96 *well* dimana dalam satu *well* memiliki konsentrasi 1×10^4 sel. Suspensi sel didistribusikan dalam *microplate* 96 *well* sebanyak 100 μl tiap *well* kemudian diinkubasi selama 24 jam pada inkubator CO_2 5% dengan suhu 37°C untuk beradaptasi dan menempel di permukaan *plate* sampai sel siap untuk diberi perlakuan.

Sebanyak 10 mg ekstrak kental dilarutkan dengan 100 μl DMSO dalam eppendorf. DMSO berfungsi sebagai *buffer* agar ekstrak dapat larut dengan baik. Pelarut DMSO (*Dimetil Sulfoksida*) digunakan untuk membuat larutan uji sampel karena DMSO telah digunakan secara luas untuk melarutkan senyawa organik maupun anorganik yang tidak bersifat toksik terhadap sel HepG2 dan sel Vero, tidak mengganggu pertumbuhan sel, tidak mudah menguap, dan biasa digunakan dalam uji kultur. Larutan tersebut digunakan untuk melarutkan ekstrak dalam pembuatan larutan stok sampel uji, kemudian dari larutan stok tersebut dibuat seri konsentrasi (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6) $\mu\text{g}/\text{ml}$. Hal tersebut bertujuan untuk mengetahui signifikansi peningkatan konsentrasi sampel uji terhadap efek anti proliferasi sel yang dihasilkan. Masing-masing konsentrasi dipipet 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dimasukkan dalam *microplate* yang telah berisi sel lalu diinkubasi selama 24 jam.



Keterangan :

- ➡ Sel HepG2 hidup sebelum pemberian MTT
- ➡ Sel HepG2 mati sebelum pemberian MTT
- ➡ Sel HepG2 hidup setelah pemberian MTT
- ➡ Sel HepG2 mati setelah pemberian MTT

Gambar 7. Morfologi sel HepG2 dari ekstrak daun pucuk merah: a) sebelum pemberian MTT pada konsentrasi 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$; b) setelah pemberian MTT pada konsentrasi 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

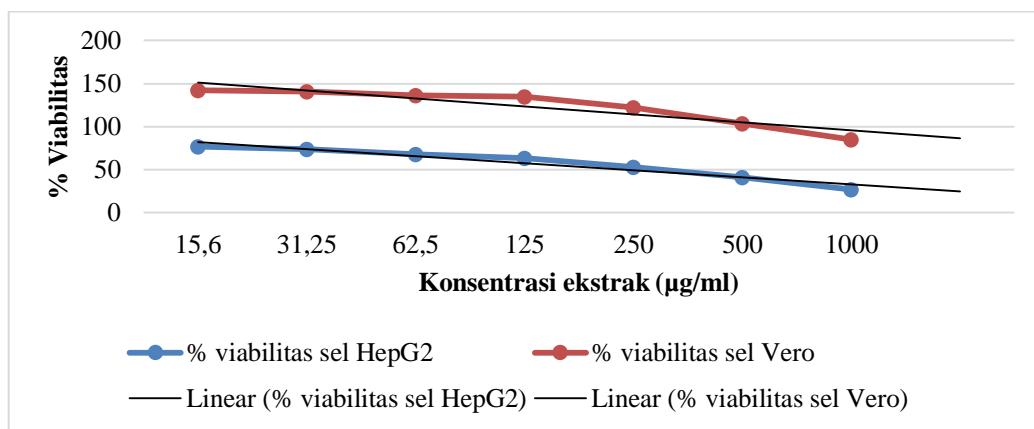
Berdasarkan gambar diatas dapat dilihat bahwa sel yang hidup masih memiliki sitoplasma sehingga dapat meneruskan cahaya dari mikroskop. Sedangkan sel mati yang ditunjukkan panah kuning terlihat berwarna keruh karena terlepas dari permukaan *microplate* dan melayang bersama media. Sehingga sel yang masih hidup akan menempel pada permukaan *microplate* dan sel yang mati akan ikut terbuang bersama media. Setelah diberi perlakuan dengan larutan uji, media kultur dibuang dan pada masing-masing sumuran ditambahkan 100 µl MTT 0,3% dalam PBS. *Microplate* diinkubasikan kembali selama 4 jam pada inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C.

MTT pada mitokondria sel dihentikan dengan penambahan SDS karena reaksi antara enzim tersebut dengan MTT berlangsung secara berkelanjutan sehingga diperlukan reagen *stopper*. Kristal formazan yang terbentuk pada sel yang hidup akan memberikan warna ungu dimana warna tersebut akan semakin bertambah pekat intensitasnya dengan menurunnya konsentrasi ekstrak. Pada konsentrasi tertinggi intensitas warna ungu semakin memudar atau rendah, hal ini menunjukkan sel yang hidup pada konsentrasi 1000 µg/ml sangat sedikit namun pada konsentrasi selanjutnya terjadi peningkatan intensitas warna ungu yang mengindikasikan bahwa dengan semakin menurunnya konsentrasi dari ekstrak etanol daun pucuk merah maka efek penghambatan pertumbuhannya terhadap sel HepG2 dan sel Vero juga berkurang.

Tabel 8. Hasil perhitungan % viabilitas ekstrak etanol daun pucuk merah

Konsentrasi (µg/ml)	% viabilitas sel HepG2	% viabilitas sel Vero
1000	27,22	84,66
500	41,48	103,36
250	53,12	122,06
125	63,66	134,59
62,5	67,91	136,34
31,25	72,20	137,96
15,6	74,46	140,34

Kristal formazan yang larut dalam SDS kemudian diukur absorbansinya dan disajikan dalam bentuk grafik % viabilitas sel dengan konsentrasi ekstrak etanol daun pucuk merah (Gambar 8). Berdasarkan grafik tersebut, aktivitas ekstrak etanol daun pucuk merah menunjukkan % viabilitas sel yang semakin berkurang seiring bertambahnya konsentrasi ekstrak.



Gambar 8. Grafik hubungan konsentrasi ekstrak etanol daun pucuk merah terhadap % viabilitas sel HepG2 dan sel Vero.

Perhitungan nilai IC_{50} pada penelitian ini dilakukan dengan persamaan regresi linear yang menggambarkan hubungan antara persen (%) viabilitas sel HepG2 maupun sel Vero dengan konsentrasi sampel uji. Persamaan regresi linear dilakukan pada 7 titik konsentrasi yaitu 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 62,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 31,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, dan 15,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$. IC_{50} dihitung dengan persamaan $y = a + bx$, dengan y adalah persen viabilitas sel dan x adalah konsentrasi senyawa.

Tabel 9. Hasil pengamatan ekstrak pada sel HepG2

Konsentrasi ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Rata-rata absorbansi	% viabilitas sel HepG2	Persamaan regresi linear	Hasil IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
1000	0,279	27,22	$y = 70,589 - 0,0474x$	434,367
500	0,386	41,48	$R^2 = 0,9408$	
250	0,474	53,12	$R = 0,9699$	
125	0,553	63,66		
62,5	0,585	67,91		
31,25	0,617	72,20		
15,6	0,634	74,46		

Tabel 10. Hasil pengamatan ekstrak pada sel Vero

Konsentrasi ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Rata-rata absorbansi	% viabilitas sel Vero	Persamaan regresi linear	Hasil IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
1000	0,482	84,66	$y = 139,27 - 0,0582x$	1.533,849
500	0,571	103,36	$R^2 = 0,9711$	
250	0,660	122,06	$R = 0,9854$	
125	0,720	134,59		
62,5	0,728	136,34		
31,25	0,736	137,96		
15,6	0,747	140,34		

Tabel 11. Hasil pengamatan cisplatin pada sel HepG2

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Rata-rata absorbansi	% viabilitas sel HepG2	Persamaan regresi linear	Hasil IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
100	0,312	31,65	$y = 63,271 - 0,3061x$	43,355
50	0,465	52,01	$R^2 = 0,9026$	
25	0,481	54,05	$R = 0,9501$	
12,5	0,490	55,33		
6,25	0,512	58,17		
3,125	0,545	62,59		
1,5625	0,588	68,35		

Tabel 12. Hasil pengamatan cisplatin pada sel Vero

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi	% viabilitas sel Vero	Persamaan regresi linear	Hasil IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
100	0,392	29,01	$y = 61,919 - 0,3708x$	32,144
50	0,476	37,59	$R^2 = 0,9076$	
25	0,568	46,99	$R = 0,9527$	
12,5	0,659	56,28		
6,25	0,712	61,70		
3,125	0,729	63,43		
1,5625	0,743	64,86		

Berdasarkan tabel 9 didapatkan persamaan linear untuk ekstrak etanol daun pucuk merah terhadap sel HepG2 yaitu $y = 70,589 - 0,0474x$ dengan nilai $R^2 = 0,9408$ dan $R = 0,9699$. Tabel 10 didapatkan persamaan linear untuk ekstrak etanol daun pucuk merah terhadap sel Vero yaitu $y = 139,27 - 0,0582x$ dengan nilai $R^2 = 0,9711$ dan $R = 0,9854$. Nilai y digunakan untuk mencari nilai IC₅₀ sehingga didapat nilai IC₅₀ ekstrak etanol daun pucuk merah terhadap sel HepG2 sebesar 434,367 $\mu\text{g/ml}$ dan terhadap sel Vero sebesar 1.533,849 $\mu\text{g/ml}$.

Tabel 11 didapatkan persamaan linear untuk kontrol positif (Cisplatin) terhadap sel HepG2 yaitu $y = 63,271 - 0,3061x$ dengan nilai $R^2 = 0,9026$ dan $R = 0,9501$. Tabel 12 didapatkan persamaan linear untuk kontrol positif (Cisplatin) terhadap sel Vero yaitu $y = 61,919 - 0,3708x$ dengan nilai $R^2 = 0,9076$ dan $R = 0,9527$. Nilai y digunakan untuk mencari nilai IC₅₀ sehingga didapat nilai IC₅₀ ekstrak etanol daun pucuk merah terhadap sel HepG2 sebesar 434,367 $\mu\text{g/ml}$ dan terhadap sel Vero sebesar 1.533,849 $\mu\text{g/ml}$.

Menurut Abdel-Hameed *et al.* (2012) ekstrak dikatakan sangat poten jika memiliki nilai IC₅₀ $\leq 20 \mu\text{g/ml}$, kategori sitotoksik moderat atau cukup poten jika

nilai IC_{50} masuk dalam range 21-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, kategori sitotoksik lemah atau kurang poten jika nilai IC_{50} masuk dalam range 201-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dan jika nilai $IC_{50} \geq 500 \mu\text{g}/\text{ml}$ termasuk kategori tidak toksik dengan kata lain semakin kecil nilai IC_{50} yang dihasilkan suatu senyawa maka semakin besar aktivitas sitotoksiknya. Berdasarkan kriteria tersebut dapat dikatakan bahwa ekstrak etanol daun pucuk merah pada penelitian ini menunjukkan aktivitas sitotoksik yang kurang poten terhadap sel HepG2 dan tidak toksik terhadap sel Vero.

Senyawa dalam ekstrak daun pucuk merah yang memiliki aktivitas sitotoksik diantaranya adalah senyawa metabolit sekunder jenis flavonoid dan alkaloid. Senyawa flavonoid dan alkaloid dikatakan terbukti toksik sebagai antikanker karena dilihat dari nilai IC_{50} yang diperoleh. Flavonoid dan alkaloid memiliki mekanisme sebagai antikanker karena flavonoid sebagai antioksidan yaitu melalui mekanisme pengaktifan jalur apoptosis sel kanker. Mekanisme apoptosis sel pada teori ini akibat fragmentasi DNA. Fragmentasi ini diawali dengan dilepasnya rantai proksimal DNA oleh senyawa oksigen reaktif seperti radikal hidroksil. Efek lainnya adalah flavonoid sebagai penghambat proliferasi tumor/kanker yang salah satunya dengan menginhibisi aktivitas protein kinase sehingga menghambat jalur transduksi sinyal dari membran ke sel inti.

Flavonoid menghambat aktivitas reseptor tirosin kinase, karena aktivitas reseptor tirosin kinase yang meningkat berperan dalam pertumbuhan ke ganasan sel kanker. Flavonoid juga berfungsi untuk mengurangi resistensi tumor terhadap agen kemoterapi. Penyebab lain flavonoid dapat membunuh sel kanker disebabkan karena adanya menyebabkan gugus OH⁻ pada flavonoid berikatan dengan protein integral membran sel. Hal ini menyebabkan terbendungnya transpor aktif Na⁺ ke K⁺. Transpor aktif yang berhenti menyebabkan pemasukan ion Na⁺ yang tidak terkendali ke dalam sel, hal ini menyebabkan pecahnya membran sel. Pecahnya membran sel inilah yang menyebabkan kematian sel (Nurhayati 2006).

Alkaloid yang berasal dari tumbuhan memiliki mekanisme sitotoksik yaitu berperan sebagai tubulin inhibitor. Pada proses siklus sel alkaloid berikatan dengan tubulin yaitu suatu protein yang menyusun mikrotubulus. Terikatnya

tubulin pada alkaloid mengakibatkan polimerisasi protein menjadi mikrotubulus akan terhambat sehingga pembentukan spindle mitotik akan terhambat pula. Siklus sel akan terhenti pada metafase karena tidak dapat melakukan pembelahan sel, sel tersebut kemudian akan mengalami apoptosis (Bertomi 2011).

Penelitian yang dilakukan oleh Aisha *et al.* (2013) diperoleh hasil IC₅₀ dari ekstrak metanol daun *Syzigium campanulatum* Korth adalah sebesar 17,6 µg/ml. Besarnya nilai IC₅₀ pada ekstrak etanol daun pucuk merah terhadap sel HepG2 dapat disebabkan oleh berbagai faktor yang mempengaruhi, diantaranya seperti perbedaan penggunaan pelarut dalam proses ekstraksi atau kompleksitas senyawa yang terkandung di dalam ekstrak tersebut dapat memungkinkan mempengaruhi aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker. Kekurangtoksikan ini dapat disebabkan karena rendahnya kandungan senyawa kimia dalam ekstrak etanol daun pucuk merah yang berefek toksik seperti flavonoid dan alkaloid atau karena spesifitas ketoksikan terhadap sel kanker. Isolasi senyawa aktif terutama golongan flavonoid dan alkaloid serta pengujian aktivitas sitotoksik pada jenis sel kanker lain perlu dilakukan.

E. Uji Indeks Selektivitas Ekstrak Etanol Daun Pucuk Merah

Nilai indeks selektivitas menunjukkan tingkat keamanan atau selektivitas sitotoksik dari ekstrak terhadap sel kanker dan sel normal, yang dihitung dengan membandingkan nilai IC₅₀ ekstrak terhadap sel normal (sel Vero) dan IC₅₀ ekstrak terhadap sel kanker hati (sel HepG2).

Tabel 13. Hasil perhitungan indeks selektivitas.

Bahan uji	IC ₅₀ sel Vero (µg/ml)	IC ₅₀ sel HepG2 (µg/ml)	Indeks selektivitas
Ekstrak	1.533,849	434,367	3,53
Cisplatin	32,144	43,355	0,74

Nilai IC₅₀ ekstrak etanol daun pucuk merah terhadap sel Vero adalah 1.533,849 µg/ml, sedangkan nilai IC₅₀ ekstrak terhadap sel HepG2 adalah 434,367 µg/ml. Sehingga diperoleh nilai indeks selektivitas ekstrak sebesar 3,53. Ekstrak dikatakan mempunyai selektivitas yang tinggi apabila memiliki nilai indeks selektivitasnya ≥ 3 (Sutejo *et al.* 2016). Sedangkan pada cisplatin memiliki nilai

IC₅₀ pada sel Vero sebesar 32,144 µg/ml dan pada sel HepG2 sebesar 43,355 µg/ml sehingga nilai indeks selektivitas yang didapatkan sebesar 0,74. Dari nilai indeks selektivitas tersebut dapat dinyatakan bahwa ekstrak etanol daun pucuk merah memiliki tingkat selektivitas yang tinggi karena memiliki nilai IS sebesar 3,53. Nilai tersebut dapat diartikan bahwa aktivitas sitotoksik ekstrak etanol daun pucuk merah terhadap sel Vero 3,5 kali lebih rendah dibanding terhadap sel HepG2 sehingga ekstrak aman untuk digunakan sebagai antikanker karena selektif terhadap sel HepG2.