

SELECTIVITY OF PURIFIED EXTRACT FROM THE LEAVES OF *TITHONIA DIVERSIFOLIA* (HEMSLEY) A.GRAY) AGAINST HELA CELLS

SELEKTIVITAS EKSTRAK TERPURIFIKASI DAUN *TITHONIA DIVERSIFOLIA* (HEMSLEY) A.GRAY) TERHADAP SEL HELA

Mae Sri Hartati Wahyuningsih^{1*)}, Rul Afiyah Syarif¹⁾, Sri Suharmi¹⁾, Tri Murini¹⁾, Firandi Saputra²⁾, Adiguno Suryo W²⁾

¹⁾ Faculty of Medicine, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 55281

²⁾ Doctoral Program of Faculty of Medicine, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 55281

ABSTRACT

Tithonia diversifolia (Hemsley) A.Gray is a kind of plant and traditionally used to cure various diseases. The previous research found that *T.diversifolia* had antiproliferation effect on colon cancer cell (Col2). Sample preparation using biossay guided extraction and partition method, could simplify the active compounds of the extract. Research on the selectivity of purified extract from the leaves of *Tithonia diversifolia* (Hemsley) A.Gray) against HeLa cells hasn't been known yet. The aim of this research was to find out the selectivity of purified extract of *T.diversifolia*'s leaves on HeLa cell compared to vero cell and to find out the Fifty Percent Inhibition Concentration (IC_{50}), and its selectivity index. Extraction of *T. diversifolia*'s leaves were done by maceration method using chloroform and methanol. Both of extract were tested by MTT cytotoxic assay on HeLa cells in vitro with serial doses (0,24 - 500 μ g/mL). Each group was replicated 3 times. The absorbance was read using ELISA at λ 540nm. IC_{50} was analyzed by probit regression on SPSS 15 for Windows. Partition (purified extract) of the active extract was done using Petroleum eter (PE), and tested by MTT cytotoxic assay on HeLa cells in vitro. The IC_{50} methanol extract to HeLa cell in vitro is 1006,99 μ g/mL, IC_{50} chloroform extract is 16,61 μ g/mL. The IC_{50} of soluble PE is 325,33 μ g/mL. and IC_{50} of insoluble PE is 3,078 μ g/mL. The IC_{50} value of insoluble PE to Vero cell is 80,30 μ g/mL. Selectivity index of purified extract (PE insoluble extract) is 26.09.

Key words: Extraction, purification, *T. diversifolia*, HeLa cell, IC_{50} .

ABSTRAK

Tanaman kembang bulan [*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray] merupakan salah satu tanaman yang digunakan dalam pengobatan tradisional untuk berbagai penyakit. Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa kembang bulan memiliki efek antiproliferasi pada sel kanker kolon (Col2). Ekstraksi dan partisi termonitor dengan uji aktivitas merupakan metode untuk mengambil senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak. Penelitian tentang selektivitas ekstrak terpurifikasi dari ekstrak aktif daun Kembang bulan terhadap sel HeLa belum pernah diteliti sebelumnya. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui selektivitas ekstrak terpurifikasi daun Kembang Bulan pada sel HeLa dibandingkan dengan sel Vero dan menentukan nilai IC_{50} serta indeks selektivitasnya. Daun kembang bulan diekstraksi menggunakan pelarut Kloroform dan Metanol. Kedua ekstrak diuji efek sitotoksiknya pada sel HeLa dengan beberapa konsentrasi (0,12 s/d 250 μ g/mL) menggunakan metode MTT (Mosmann, 1983). Pembacaan densitas optik dengan ELISA plate reader. Persentase kematian sel dihitung dan dianalisis dengan menggunakan regresi probit pada program SPSS 15 for Windows. Setelah diketahui nilai IC_{50} kedua ekstrak tersebut, dipilih salah satu yang memiliki IC_{50} lebih kecil kemudian dipurifikasi dengan Petroleum Eter (PE) dan diuji kembali pada sel HeLa, sari yang aktif diuji juga selektivitasnya dengan sel Vero, kemudian dihitung nilai IC_{50} nya. Nilai IC_{50} ekstrak metanol sebesar 1006,99 μ g/mL, ekstrak Kloroform sebesar 16,61 μ g/mL. Nilai IC_{50} sari larut PE sebesar 325,331 μ g/mL dan IC_{50} sari tidak larut PE sebesar 3,078 μ g/mL dan nilai IC_{50} pada sel vero adalah 80,30 μ g/mL. Nilai indeks selektivitas ekstrak terpurifikasi (sari tidak larut PE) adalah 26.09.

Kata kunci: Ekstraksi, purification, *T. diversifolia*, sel HeLa, IC_{50}

PENDAHULUAN

Kanker serviks berkontribusi kurang lebih 12% dari seluruh kanker pada wanita. Di dunia kanker serviks merupakan jenis kanker terbanyak kedua pada wanita sedangkan di negara berkembang jenis kanker ini menempati peringkat pertama. Pada tahun 2000, terdapat lebih dari 471.000 kasus baru yang terdiagnosis serta terdapat 288.000 kematian akibat penyakit ini di seluruh dunia dan 80% kematian ini terjadi di negara berkembang (WHO, 2002). Kanker serviks banyak terdapat di negara miskin dan berkembang. Amerika Tengah dan Selatan, Kepulauan Karibia, Afrika Sub-Sahara, Oceania, dan Asia memiliki insidensi tertinggi yaitu >30/100.000 wanita (ACP, 2004). Di Indonesia, insidensi kanker serviks tahun 2002 adalah 10-20/100.000 wanita (Parkin *et al.*, 2005).

Obat antikanker atau sitostatika adalah obat yang dapat menghentikan pertumbuhan sel-sel kanker. Obat ini diharapkan memiliki toksisitas selektif artinya menghancurkan sel kanker tanpa merusak sel jaringan normal. Pada umumnya obat antikanker yang ada sekarang ini dapat menekan pertumbuhan atau proliferasi sel. Beberapa obat antikanker sekarang ini dapat menyebabkan resistensi dan menimbulkan efek samping yang berbahaya bagi tubuh (DeVita dan Hellman, 2001). Agar terapi kanker berhasil dengan baik, maka prinsip kerja obat antikanker harus dapat membasmi sel kanker secara total. Mekanisme kerja obat antikanker ini didasarkan atas terjadinya gangguan pada salah satu proses sel yang esensial (Nafrialdi and Gan, 1995). Oleh karena itu sangat diperlukan adanya penemuan obat baru yang mempunyai efek memuaskan dengan toksisitas rendah. Pencarian obat kanker sekarang semakin menarik dengan semakin tingginya gerakan kembali ke alam, yaitu dengan pemanfaatan fitofarmaka, menggali kandungan unsur kimiawi dalam tumbuh-tumbuhan yang potensial dapat dipakai sebagai obat (Ganiswara & Nafrialdi, 1995).

Badan Kesehatan Dunia (WHO) memperkirakan bahwa 80% populasi dunia saat ini memanfaatkan obat tradisional yang bahan bakunya berasal dari tanaman. Di Amerika Serikat sekitar 25% ramuan obat modern mengandung komponen bioaktif yang berasal dari tanaman obat. Indonesia merupakan negara yang terkenal

akan keanekaragaman hayatinya di dunia, antara lain berupa tumbuhan tropis dan biota laut, sehingga sangat potensial untuk pengembangan obat baru dan fitofarmaka (Qomariyah, 2003).

Tanaman Kembang bulan [*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray] merupakan salah satu tanaman yang secara tradisional telah digunakan masyarakat untuk obat sakit perut, diare, antidiabetes, penyakit hepar, dan penanganan luka (Moronkola *et al.*, 2006; Tona *et al.*, 1999; Miura *et al.*, 2002). Ekstrak tanaman ini juga diketahui memiliki efek antimalaria (Madureira *et al.*, 2002) dan antimikroba (Obafemi *et al.*, 2006). Gu *et al.* (2002) melaporkan bahwa ekstrak metanol *T. diversifolia* menunjukkan aktivitas antiproliferasi pada sel kanker kolon manusia (Col-2) dan aktivitas induksi diferensiasi seluler terhadap sel promyelositik leukemia manusia (HL-60). Selain itu ekstrak eter Kembang bulan mempunyai efek sitotoksik pada *cell line* adenokarsinoma kolon (HCT-116) (Goffin, 2002). Penelitian tentang efek sitotoksik ekstrak terpurifikasi dari ekstrak aktif daun Kembang bulan (*T. diversifolia*) terhadap sel HeLa belum pernah diteliti sebelumnya. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk mengkaji apakah ekstrak terpurifikasi tersebut mempunyai efek sitotoksik pada sel HeLa, selanjutnya dibandingkan dengan sel Vero dapat diketahui indeks selektivitasnya.

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui selektivitas ekstrak terpurifikasi dari ekstrak kloroform daun kembang Bulan pada sel HeLa.

METODOLOGI

Penelitian ini termasuk jenis penelitian kuasi eksperimental dengan rancangan *post-test control group design*. Subjek dalam penelitian ini adalah sel HeLa, pemberian Prof. Tatsuo Takeya, dari NAIST, Japan. Sel Vero, Pemberian dari Prof. Henk Smith dari Belanda. Sel HeLa dan Sel Vero dikembangkan di LPPT, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Bahan

Daun *T. diversifolia* (TD), diambil dari daerah Pakem bulan November 2010, ethanol (E.Merck), serbuk silika Gel GF₂₅₄ (E. Merck), media RPMI dan M199 (Sigma), FBS serum (Gibco BRL), Fungison dan Streptomisin (Sigma), Penisilin (Gibco BRL), tripsin/EDTA, DMSO, kloroform, Metanol, Petroleum Eter/PE (E.Merck).

^{*)}Correspondence : Mae Sri Hartati Wahyuningsih
E-mail : maeshw98@yahoo.com

Alat

Tabung gelas, Evaporator (Heidolph vv 2000, Germany), oven (Memert, Germany), lampu UV, *hair dryer* (Philip), *plate silica gel GF 254, chamber* (Chamag), *sentrifuge* (Hitachi 18PR/5, *Automatic high speed refrigerated*), *Microplate 96 well* (Nunclone), *sentrifuge* Sigma 3K12 (B. Braun Biotech International), blue tip dan yellow tip, CO2 *jacketed incubator* (NuairTM IR autoflow), *haemocytometer* (New Bauer), tabung *conical steril* (nunclone), *scarper*, *tissue culture flask* (nunclone), *Laminar airflow* (Nuair).

Cara Penelitian**Preparasi ekstrak kloroform dan metanol**

Lima ratus gram serbuk kering daun *T. diversifolia* dimasukkan dalam tabung kaca, diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan kloroform sebanyak 1lt, didiamkan selama 24 jam pada suhu kamar. Selanjutnya disaring dengan menggunakan corong *Buchner* dengan vakum sehingga diperoleh fase ampas dan sari kloroform. Kemudian fase ampas dimaserasi kembali sebanyak 2 kali, sedangkan sarinya dikumpulkan untuk diuapkan dengan evaporator sehingga diperoleh ekstrak kloroform kental. Ampas yang tersisa di angin-anginkan sampai tidak berbau kloroform kemudian ditambahkan metanol 1lt diamkan 24 jam pada suhu kamar. Selanjutnya disaring dan diuapkan seperti pada proses dengan pelarut kloroform sehingga diperoleh ekstrak metanol kental. Keberhasilan ekstraksi dipantau dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT)

Preparasi ekstrak terpurifikasi

Ekstrak kloroform kental yang aktif dipurifikasi menggunakan Petroleum eter (PE) dan dilakukan *sentrifuge* pada temperatur 25°C, 5000 rpm [*Sentrifuge* (Hitachi 18PR/5, *Automatic high speed refrigerated*)] selama 10 menit, sehingga diperoleh dua sari yaitu sari yang larut PE (disebut sari A1) dan sari yang tidak larut PE (disebut sari A2). Keberhasilan penyarian ini dimonitor dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) yang ditandai dengan tidak adanya atau sesedikit mungkin kesamaan bercak antara kedua sari tersebut, selanjutnya masing-masing sari diuji efek sitotoksiknya pada kultur sel HeLa.

Preparasi seri konsentrasi ekstrak

Masing-masing ekstrak kloroform, metanol dan ekstrak terpurifikasi (sari larut dan tidak larut PE) ditimbang 5,0mg dan dilarutkan dalam *Dimethyl sulphoxide* (DMSO) sebanyak 100µL, dibantu dengan alat vortex, sehingga diperoleh

larutan dengan konsentrasi 50.000µg/mL. Selanjutnya diencerkan dengan medium RPMI menjadi delapan konsentrasi yaitu: (0,24; 0,98; 3,06; 15,625; 62,5; 125; 250; 500)µg/mL.

Uji Sitotoksik dengan metode [3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-dipheniltetrazolium bromide] (MTT)

Menggunakan *microplate 96* sumuran. Setiap sumuran diisi dengan 100µL medium RPMI 1640, FBS 0,5% yang mengandung sel HeLa dengan kepadatan 2-4 x 10³sel/well, selanjutnya diinkubasikan selama 24 jam. Keesokan harinya media dibuang dan diganti dengan seri dosis sampel (0,24 s/d 500)µg/mL dalam media RPMI 1640, FBS 10%. Setiap dosis dibuat triplikat. Kultur sel tersebut diinkubasi selama 24 jam pada 37°C, 5% CO₂. Setelah 24 jam ditambahkan larutan MTT (5mg/ml PBS) (10ηL/sumuran). Kultur sel diinkubasi selama 4 jam pada 37°C, 5% CO₂. *Stop solution* (100ηL/sumuran) ditambahkan pada sel diinkubasi selama semalam pada 37°C, % CO₂, kemudian *optical density* diukur pada λ 540nm dengan *ELISA plate reader*. Pengujian yang sama terhadap sel Vero dengan uji sitotoksik terhadap sel Hela, hanya berbeda pada mediumnya yaitu M199.

Persentase penghambatan sel

Persentase penghambatan sel dari tiap-tiap konsentrasi sampel yang diperoleh dihitung dan dianalisis menggunakan rumus:

$$\% \text{penghambatan} = \frac{(A-B) - (C-B)}{(A-B)} \times 100\%$$

Keterangan:

A = rata-rata absorbansi media sel

B = rata-rata absorbansi media

C = rata-rata absorbansi sampel uji

Analisis Hasil

Efek sitotoksik ekstrak kloroform, metanol, dan hasil purifikasi daun Kembang bulan dianalisis dengan menghitung persentase penghambatan sel seperti rumus di atas, selanjutnya nilai IC₅₀ diperoleh dengan analisis regresi probit dari *SPSS 15 For Windows*.

HASIL DAN PEMBAHASAN**Ekstraksi dan hasil purifikasi Ekstrak Kloroform Daun Kembang Bulan**

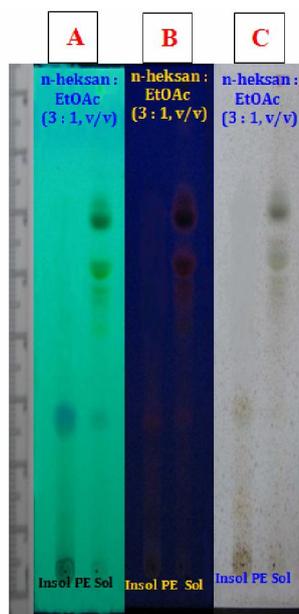
Hasil ekstraksi dengan pelarut kloroform dan metanol seperti terlihat pada Gambar 1, sedangkan hasil purifikasi dengan pelarut PE seperti terlihat pada Gambar 2.



Gambar 1. Profil KLT ekstrak metanol (MeOH) dan kloroform (CHCl₃) *T. diversifolia* deteksi dengan reagen Serum sulfat

Fase diam : Silika Gel GF₂₅₄

Fase gerak: Wasbensen: Etil asetat (3:1, v/v)



Gambar 2. Profil KLT Hasil purifikasi (Larut PE dan tidak larut PE) menggunakan fase diam (silika gel GF₂₅₄) dan fase gerak {n-heksan : etil asetat (3:1; v/v)}

Deteksi : A. UV 254 B. UV 366 C. Serum sulfat.

Uji Sitotoksik Ekstrak Metanol, Ekstrak Kloroform, dan Hasil purifikasi ekstrak aktif Daun Kembang bulan

Persentase kematian sel HeLa setelah pemberian ekstrak kloroform dan metanol diperoleh dengan melakukan perhitungan sesuai rumus Meyer (1982), dan datanya disajikan dalam Tabel I.

Tabel I. Rerata nilai persentase kematian sel setelah inkubasi 24 jam dari ekstrak metanol, dan ekstrak kloroform *T. diversifolia* pada kultur sel HeLa

Konsentrasi (µg/mL)	Rata-rata % Kematian sel	
	Ekstrak Kloroform	Ekstrak Metanol
0,24	7,59	15,70
0,98	3,54	0,84
3,06	13,08	2,11
15,63	37,22	5,49
62,50	73,00	16,03
125	84,05	35,19
250	79,58	34,77
500	66,50	49,20

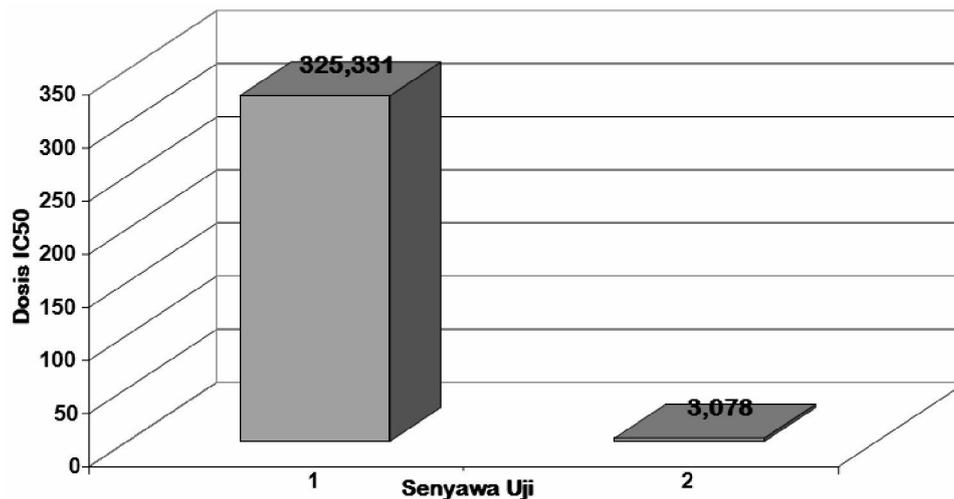
Nilai IC₅₀ diperoleh dengan menggunakan analisis probit pada program *SPSS for Windows 15 version*. Dari analisis probit didapatkan hasil nilai IC₅₀ ekstrak kloroform sebesar 16,61µg/mL, dan ekstrak metanol sebesar 1006,99µg/mL. Selanjutnya ekstrak kloroform yang aktif dilakukan purifikasi dengan PE sehingga diperoleh sari larut dan tidak larut PE dan diuji efek sitotoksiknya. Hasilnya seperti pada tabel II.

Tabel II. Rerata persentase kematian sel dari ekstrak terpurifikasi (larut PE dan tidak larut PE) *T. diversifolia* pada kultur sel HeLa

Konsentrasi (µg/mL)	Rata-rata % Kematian Sel	
	Sari larut PE	Sari tidak larut PE
0,12	14,9	21,81
0,49	24,6	20,74
1,9	20,74	35,11
7,8	23,93	64,89
31,25	42,2	64,89
62,5	42,65	91,48
125	46,8	94,14
250	47,34	98,40

Tabel III. Rerata persentase kematian sel dari ekstrak terpurifikasi (sari tidak larut PE) *T. diversifolia* pada kultur sel HeLa dan sel Vero

Konsentrasi (µg/mL)	Ekstrak terpurifikasi	
	Rata-rata % Kematian Sel	Rata-rata % Kematian Sel
	HeLa	Vero
0,12	21,81	10,09
0,49	20,74	12,10
1,9	35,11	12,16
7,8	64,89	18,47
31,25	64,89	45,09
62,5	91,48	48,89
125	94,14	71,99
250	98,40	83,81
Nilai IC ₅₀	3,078	80,30



Gambar 3. Grafik Perbandingan nilai IC₅₀ sari larut PE dan sari tidak larut PE
Keterangan : 1 : Sari larut PE; 2 : Sari tidak larut PE.

Ekstraksi dan purifikasi ekstrak Kloroform daun Kembang Bulan

Ekstraksi daun Kembang bulan (*T. diversifolia*) dengan pelarut kloroform bertujuan untuk mendapatkan senyawa aktif yang bersifat semipolar sampai non-polar. Sedangkan senyawa aktif daun Kembang bulan yang bersifat polar dilarutkan dengan menggunakan pelarut metanol.

Dilihat dari profil KLT (Gambar 1), menandakan bahwa proses ekstraksinya telah sempurna dimana senyawa semipolar sampai non-polar dari daun Kembang bulan *T. diversifolia* (Hemsley) A. Gray telah tersari dengan sempurna.

Profil KLT pada Gambar 2, tampak perbedaan yang cukup jelas antara sari tidak larut PE dengan sari larut PE, di mana terjadi pemisahan yang sempurna antara kedua senyawa tadi. Pemisahan sempurna ditandai dengan sedikitnya atau tidak adanya bercak-bercak senyawa yang duplikasi antara kedua profil senyawa tersebut. Kepastian tidak adanya duplikasi antara kedua senyawa ini sangat penting karena bisa jadi pada duplikasi senyawa tersebut terkandung senyawa aktif yang akan membuat data perbandingan efek sitotoksik antar kedua senyawa menjadi tidak valid.

Fase gerak yang digunakan pada KLT adalah n-heksan dan etil asetat dengan perbandingan 3:1,v/v. n-heksan bersifat non-polar sedangkan etil asetat bersifat polar. Besarnya volume n-heksan dibandingkan etil asetat mengakibatkan sari larut PE yang bersifat non-polar lebih banyak yang tertarik ke atas dibandingkan sari tidak larut PE yang cenderung bersifat semipolar. Setelah penyempotan dengan

reagen Serium Sulfat, pemisahan bercak antara kedua senyawa menjadi lebih jelas. Hal ini menunjukkan bahwa proses purifikasi telah sempurna di mana senyawa non-polar dengan senyawa semi polar dari ekstrak kloroform daun Kembang bulan telah terpisahkan sempurna.

Uji Sitotoksik Ekstrak Metanol, Ekstrak Kloroform, dan Hasil purifikasi ekstrak aktif Daun Kembang bulan

Parameter sitotoksik yang digunakan adalah kemampuan konversi substrat MTT menjadi formazan ungu oleh enzim suksinat dehidrogenase pada sel hidup. Pengujian efek sitotoksik dilakukan dengan triplikat, yakni masing-masing konsentrasi diujikan pada tiga sumuran untuk menghindari bias dalam penelitian ini. Sifat sitotoksik merupakan langkah utama dalam usaha penemuan obat antikanker baru dari bahan alam (Nooter, 1997; Nooter *et al.*, 1999). Penelitian antikanker yang bertitik berat pada bagaimana mekanisme sel kanker terbunuh oleh obat-obat sitotoksik, merupakan ilmu yang baru berkembang saat ini.

Menurut kriteria *National Cancer Institute* (NCI) suatu zat dikatakan aktif bersifat sitotoksik apabila memiliki nilai IC₅₀ kurang dari 20 µg/ml (Benzivin *et al.*, 2003). Dengan demikian, ekstrak kloroform yang diujikan memiliki kemampuan sitotoksik (IC₅₀ = 16,61 µg/ml), dan berpotensi untuk dikembangkan sebagai senyawa antikanker, sedangkan ekstrak metanol (IC₅₀ = 1006,99 µg/ml) tidak memiliki kemampuan sitotoksik.

Penilaian aktivitas sitotoksik ekstrak terpurifikasi daun Kembang bulan dilakukan

dengan memberikan sari larut PE dan sari tidak larut PE pada kultur sel HeLa. Hasil yang diperoleh berupa data absorbansi masing-masing sumuran yang telah diberi senyawa uji berbagai konsentrasi. Dari data absorbansi tersebut, kemudian dibuat rata-rata persentase kematian sel untuk setiap konsentrasi senyawa uji dengan menggunakan rumus *Abbot* termodifikasi. Secara umum, tampak bahwa seiring dengan kenaikan konsentrasi senyawa uji, baik senyawa larut PE maupun senyawa tidak larut PE, didapatkan pula kenaikan persentase kematian sel, hal ini dinamakan dengan fenomena *dose dependent*. Berdasarkan hasil uji analisis probit, didapatkan bahwa nilai IC_{50} senyawa larut PE ($325,331\mu\text{g/mL}$), jauh lebih besar dibandingkan nilai IC_{50} senyawa tidak larut PE ($3,078\mu\text{g/mL}$). Hal ini menunjukkan bahwa senyawa tidak larut PE memiliki efek sitotoksik lebih besar dibandingkan senyawa larut PE. Selain itu dapat disimpulkan bahwa senyawa aktif yang lebih poten sebagai antikanker lebih banyak terkandung dalam senyawa tidak larut PE. Setelah dihitung nilai IC_{50} terhadap sel HeLa maka dapat dihitung pula indeks selektivitasnya terhadap sel normal (vero) yaitu IC_{50} sel normal dibagi dengan IC_{50} sel HeLa. Semakin tinggi angka selektivitasnya maka senyawa tersebut semakin baik. Angka indeks selektivitas dari ekstrak terpurifikasi dari ekstrak kloroform terhadap sel HeLa sebesar 26,09. Suatu ekstrak dikatakan bersifat selektif apabila mempunyai indeks selektivitas >10 .

Penelitian ini menggunakan ekstrak kloroform daun Kembang bulan, di mana sebagian besar senyawa dalam ekstrak tersebut bersifat non polar hingga semi polar karena kloroform mampu melarutkan senyawa semi polar hingga non polar. Kemudian ekstrak kloroform dipurifikasi dengan PE yang bersifat non polar, sehingga terdapat dua golongan senyawa terpisah menurut sifat kepolarannya. Senyawa larut PE yang cenderung bersifat non polar, dan tidak larut PE yang bersifat semi polar.

Hutapea, (1994) menyatakan bahwa daun, kulit batang, dan akar *T. diversifolia* mengandung saponin, polifenol, dan flavonoid. Selain itu Baruah *et al.* (1979) menyatakan bahwa di antara senyawa metabolit sekunder daun *T. diversifolia* adalah golongan *sesquiterpenlactones*. Senyawa *sesquiterpenlactones* ini, di antaranya tagitinin C yang memiliki aktivitas antiproliferasi terhadap sel kanker kolon (Col-2) (Gu *et al.*, 2002). Garcia & Delgado, (2006) menyebutkan bahwa efek sitotoksik tagitinin A dan C ditunjukkan terhadap sel K-562 (sel leukemia) dan *cell line* HCT-15 (sel turunan kanker kolon pada manusia).

Berdasarkan uraian di atas, maka masih perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai efek sitotoksik senyawa tidak larut PE hasil purifikasi ekstrak kloroform daun Kembang bulan [*T. diversifolia*] terutama mengenai senyawa aktif mana yang berperan dalam aktivitas sitotoksik tersebut. Diharapkan isolasi dan identifikasi senyawa aktif tersebut pada penelitian selanjutnya menjadi langkah awal dalam penemuan dan pengembangan obat kanker alternatif dari bahan alam.

KESIMPULAN

Ekstrak kloroform daun Kembang bulan (*T. diversifolia*) memiliki efek sitotoksik ($IC_{50} = 16,61\mu\text{g/mL}$) terhadap sel HeLa lebih besar dibandingkan dengan ekstrak metanol ($IC_{50} = 1006,99\mu\text{g/mL}$). Ekstrak terpurifikasi dari ekstrak kloroform (tidak larut PE) daun Kembang bulan (*T. diversifolia*) memiliki efek sitotoksik terhadap sel HeLa dengan nilai $IC_{50} = 3,078\mu\text{g/mL}$ dan Indeks Selektivitas sebesar 26,09.

DAFTAR PUSTAKA

- Alliance for Cervical Cancer Prevention (ACP), 2004. Preventing Cervical Cancer World Wide. Population Reference Bureque, Washington.
- Baruah NC, Sharma RP, Madhusudanan KP, Thyagarajan G, 1979, Sesquiterpene Lactones of *Tithonia diversifolia*. Stereochemistry of the Tagitinins and Related Compounds. J. Org. Chem. 44(11):1831
- Benzivin C, Devehat, Tomasi S, Boustie J, 2003, Cytotoxic Activities of some Lischen Extracts on Murine and Humasn Cancer Cell Lines. Phytomedicine, 10:499-503.
- Boyd, M.R., 1997. The NCI In Vitro Anticancer Drug Discovery Screen. Concept, Implementation, and Operation, 1985-1995. Dalam: Teicher, B. (ed.): Drug Development: Preclinical Screening, Clinical Trials and Approval. Humana Press, Totowa. p. 23-42.
- DeVita, V.T., Hellman, S., dan Rosenberg, S.A. (Eds.), 2001. Cancer: Principles and Practices of Oncology. 6th ed. Lippincot William and Wilkins, Philadelphia.
- Freshney, R.I., 2000. Culture of Animal Cells Manual of Basic Technique. A John Wiley and Sons Ltd, New York.
- Ganiswara, S., dan Nafrialdi. 1995. Antikanker dan Immunosupresan, dalam Ganiswara, S., (Ed), Farmakologi dan Terapi, Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

- García A, dan Delgado G, 2006, Constituents from *Tithonia diversifolia*. Stereochemical Revision of 2 α -Hydroxytirodunin. *J. Mex. Chem. Soc.* 50(4):180-3
- Goffin,E., Ziemons,E., De Mol,P., de Madureira Mdo,C., Martins,A.P., da Cunha,A.P., Philippe,G., Tiys,M., Angenot,L., dan Frederich,M., 2002. In vitro antiplasmodial activity of *Tithonia diversifolia* and identification of its main active constituent: Tagitin C. *Planta Medica* 68(6):543-545.
- Gu,J.Q., Gills,J.J., Park,E.J., Mata-Greenwood,E., Hawthorne,M.E., Axelrod,F., Chavez,P.I., Fong,H.H., Mehta,R.G., Pezzuto,J.M., dan Kinghorn,A.D., 2002. Sesquiterpenoids from *Tithonia diversifolia* with potential chemo preventive activity. *J Nat Prod* 65(4),532-536.
- Hutapea JR, 1994, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*. Badan Peneliti dan Pengembangan Kesehatan R.I., Jakarta.
- Madureira, M. C., Martins, A. P., Gomes, M., Paiva, J., Cunha, A. P., dan Rosario, V., 2002. Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S. Tome and Principe islands. *J. Ethnopharmacol* 81:23 – 9.
- Miura, T., Furuta, K., Yasuda, A., Iwamoto, N., Kato, M., Ishihara, E., Ishida, T., dan Tanigawa, K.,2002. Antidiabetic effect of Nitobegiku in KK-Ay diabetic mice. *The American Journal of Chinese Medicine* 30(1):81–6.
- Moronkola,D.O., Ogunwade,I.A., Walker,T.M., Setzer,W.N., dan Oyewole,I.O., 2006. Identification of the main volatile compounds in the leaf and flower of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) Gray. *J Nat Med* 61:63-66
- Mosman,T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 65,55-63.
- Nooter K, 1997, The role of P₅₃ in resistance to cytotoxic therapy of human cancer. *South West Cancer News.* 4, 12-13
- Nooter K, Burger H, Schenk P, Stoter G, 1999, Molecular mechanisms of drug resistance and sensitivity. *Oncological Research at the Erasmus University Rotterdam-University Hospital Rotterdam,* 39-40
- Obafemi,C.A.,Sulaimon,T.O., Akinpelu, D.A., dan Olugbade, T.A., 2006. Antimicrobial activity of extract and a germacranolidetype sesquiterpene lactone from *Tithonia diversifolia* leaf extract. *African Journal of Biotechnology.* Vol 5 (12),pp 1254-1258.
- Parkin,D.M., Bray,F., Ferlay,J., dan Pisani,P., 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55: 74-108.
- Qomariyah,N., 2003. Herbal medicine: Pentingnya mengenal dan memahaminya. *Mutiara Medika Jurnal Kedokteran Kesehatan* 1(2):38-41.
- Tona,L., Kambu,K., Mesia,K., Cimanga,K., Apers,S., De Brynne,T., Pieters,L., Totte,J., dan Vlietinck,A.J., 1999. Biological screening of traditional preparation from some medicinal plants used as antidiarrhoeal in Kinshsa Kongo. *Phytomedicine* 6(1): 59-66.
- World Health Organization, 2002. *Cervical Cancer Screening in Developing Countries: Report of a WHO Consultation.* WHO, Geneva.