

**MEKANISME KO-KEMOTERAPI EKSTRAK ROSELLA (*Hibiscus sabdariffa*. L) DENGAN DOXORUBICIN PADA SEL KANKER SERVIKS (HeLa) SECARA *IN VITRO***

**Intan Daud<sup>1</sup>, Laela Hayu Nurani<sup>1\*</sup>, Moch. Saiful Bachri<sup>1</sup>, Citra Ariani Edityaningrum<sup>1</sup>, Muhammad Ma'ruf<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta, Indonesia

<sup>2</sup>Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan ISFI Banjarmasin, Banjarmasin, Indonesia

Email: [laela.farmasi@pharm.uad.ac.id](mailto:laela.farmasi@pharm.uad.ac.id)

Artikel diterima: 02 Agustus 2024; Disetujui: 18 Oktober 2024

DOI: <https://doi.org/10.36387/jiis.v5i1.2158>

**ABSTRAK**

Kanker serviks disebabkan karena paparan Human Papilloma Virus (HPV) melalui hubungan seksual yang dapat diobati dengan Doxorubicin. Doxorubicin menunjukkan efek samping sehingga perlu dikombinasikan dengan ko-kemoterapi. Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) mengandung antosian yang bersifat sitotoksik pada sel HeLa. Tujuan penelitian ini adalah mencari ko-kemoterapi kombinasi Doxorubicin dan ekstrak Etanol Bunga Rosella dengan mekanisme apoptosis serta antiproliferasi Rosella.

Metode penelitian dimulai dari proses maserasi kelopak Bunga Rosella menggunakan etanol 96%. Metode uji sitotoksik, antiproliferasi, apoptosis, dan kombinasi dengan metode MTT menggunakan sel HeLa.

Hasil dari uji sitotoksik menunjukkan  $IC_{50}$  Ekstrak Etanol Rosella sebesar  $32,3 \pm 2,15 \mu\text{g/mL}$  dan  $IC_{50}$  Doxorubicin sebesar  $2,68 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$ . Hasil uji antiproliferasi pada kontrol sel nilai *doubling time*  $28,25 \pm 0,21$  jam sedangkan konsentrasi Ekstrak Etanol Bunga Rosella pada kadar 32,3; 16,15; dan 8,08  $\mu\text{g/mL}$  nilai *doubling time*  $53,23 \pm 0,20$  jam,  $39,02 \pm 0,19$  jam dan  $46,74 \pm 0,23$  jam sehingga menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan penggandaan sel. Hasil CI menunjukkan kombinasi 4,04  $\mu\text{g/mL}$  Ekstrak Etanol Bunga Rosella dan 2,67  $\mu\text{g/mL}$  Doxorubicin yaitu 0,0013 dapat diinterpretasikan adanya efek sinergis yang sangat kuat ( $0,0013 \leq 0,1$ ). Sehingga dapat disimpulkan bahwa kombinasi Ekstrak Etanol Bunga Rosella mempunyai sifat antiproliferasi melalui mekanisme penundaan waktu penggandaan.

**Kata kunci:** Serviks; Kanker; Ko-kemoterapi; Rosella; Doxorubicin

**ABSTRACT**

*Cervical cancer caused by exposure to Human Papilloma Virus (HPV) through sexual intercourse can be treated with Doxorubicin. Doxorubicin shows side effects so it needs to be combined with co-chemotherapy. Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) The main content of anthocyanins is cytotoxic to HeLa cells. The purpose of this study was to find co-chemotherapy combination of Doxorubicin and Rosella extract with apoptosis mechanism and Rosella antiproliferation.*

*The research method starts from the maceration process of Rosella petals using 96% ethanol. Cytotoxic test method, antiproliferation test, apoptosis, and combination test with MTT method using HeLa cells.*

*The result of cytotoxic test showed  $IC_{50}$  of Rosella extract was  $32.3 \pm 2.15$   $\mu\text{g/mL}$  and  $IC_{50}$  of Doxorubicin was  $2.68 \pm 0.09$   $\mu\text{g/mL}$ . The antiproliferation test results in the control cell doubling time of  $28.25 \pm 0.21$  hours while the concentration of Rosella extract at levels of 32.3; 16.15; and 8.08  $\mu\text{g/mL}$  doubling time of  $53.23 \pm 0.20$  hours,  $39.02 \pm 0.19$  hours and  $46.74 \pm 0.23$  hours so that it shows the inhibition of cell multiplication growth. The IC results show the combination of 4.04  $\mu\text{g/mL}$  Rosella Flower Extract and 2.67  $\mu\text{g/mL}$  Doxorubicin which is 0.0013 can be interpreted as a very strong synergistic effect ( $0.0013 \leq 0.1$ ). So it can be concluded the combination of ethanol extract Rosella flowers has antiproliferation properties through the mechanism of delaying the doubling time.*

**Keywords:** *Cervix, Cancer, Co-chemotherapy, Hibiscus sabdariffa; Doxorubicin*

## **PENDAHULUAN**

Pada tahun 2020, Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) mengantisipasi sekitar 604.000 kasus baru dan 342.000 kematian akibat kanker serviks, penyakit yang terutama ditularkan melalui hubungan seksual. Menurut data terbaru dari *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN) tahun 2023, kanker serviks masih menjadi masalah kesehatan yang signifikan secara global. Pada tahun 2022, kasus kanker serviks global diproyeksikan mencapai 661.044 kasus, dengan 348.186 kematian. Dengan perkiraan 36.633 kasus baru dan 22.556 kematian pada tahun 2022, kanker serviks menempati peringkat ketiga di antara kanker wanita di Indonesia.

Prevalensi kanker serviks di Indonesia mencapai 10,5% dari seluruh kasus kanker pada wanita, dengan angka kejadian sebesar 23,4 per 100.000 populasi.

Human Papillomavirus (HPV) adalah virus menular seksual yang dapat menyebabkan kanker serviks. Kanker serviks yang berhubungan dengan HPV disebabkan oleh infeksi akibat adanya molekul protein onkogen HPV, khususnya E6 dan E7, yang mengaktifkan jalur kematian dalam biologi molekuler (Novalia, 2023).

Metode penurunan keterjadian kanker serviks di antaranya adalah dengan vaksinasi, pembedahan, radiasi, kemoterapi (Centers for Disease Control and Prevention,

2022). Kemoterapi dapat dilakukan dengan obat sintesis maupun obat herbal. Obat sintesis yang sering digunakan adalah cisplatin, cytodrox, dan Doxorubicin (Matyszewska *et al.*, 2021).

Pemberian Doxorubicin untuk kemoterapi kanker serviks terus dikaitkan dengan efek samping yang signifikan. Penggunaan Doxorubicin dalam jangka panjang dapat menyebabkan perkembangan kardiomiopati dan gagal jantung kongestif. Selain itu, penggunaan Doxorubicin juga menunjukkan penurunan efektivitas pengobatan kanker akibat resistensi obat. Doxorubicin memicu kematian sel kanker melalui banyak cara dengan menyebabkan stres oksidatif, yang ditandai dengan perubahan penumpukan spesies oksigen reaktif (ROS) dan berkurangnya pertahanan antioksidan. Cedera stres oksidatif sangat terkait dengan apoptosis. (Wang *et al.*, 2022).

Studi klinis menunjukkan bahwa sekitar 10-26% pasien yang menerima Doxorubicin mengalami kardiomiopati dan gagal jantung kongestif, dengan risiko yang

meningkat seiring peningkatan dosis kumulatif. Sebuah meta-analisis terbaru melaporkan bahwa insiden kardiomiopati terkait Doxorubicin pada pasien kanker serviks mencapai 18% (95% CI: 12-25%) (Volkova & Russel, 2011)

Penggunaan ko-kemoterapi pada pasien kanker serviks dengan Doxorubicin telah mulai dieksplorasi dalam beberapa tahun terakhir. Beberapa studi klinis fase awal telah mengevaluasi kombinasi Doxorubicin dengan agen seperti cisplatin atau paclitaxel, namun hasil yang diperoleh masih bervariasi. Hingga saat ini, belum ada ko-kemoterapi berbasis bahan alam yang telah disetujui untuk penggunaan klinis bersama Doxorubicin pada kanker serviks (Gaducci, *et. al*, 2020).

Ekstrak Rosella (*Hibiscus sabdariffa*. L) adalah salah satu contoh tanaman yang dikenal karena peranannya yang bermanfaat dalam pengobatan dan pencegahan beberapa penyakit. Tanaman ini mengandung fitokimia yang mencakup alkaloid, antosianin, fenol, saponin, tanin, dan flavonoid. Konstituen aktif (*H. sabdariffa*. L) telah digunakan untuk

pengobatan beberapa jenis kanker dan penyakit lainnya. Berdasarkan penelitian lain menyatakan bahwa fraksi yang mengandung flavonoid terikat dan bebas yang dibuat dari Ekstrak Etanol Bunga Rosella efektif untuk menginduksi penangkapan siklus sel pada fase G0/G1, sehingga mencegah perkembangan sel kanker serviks (Aina *et al.*, 2021) Bahan utamanya, antosianin, telah terbukti dapat menstimulasi sel otot rangka secara *in vitro* dalam penelitian.

Kandungan antioksidan dari (*H. sabdariffa*. L) diantaranya senyawa metabolit fenol dan flavonoid seperti antosian, dilaporkan sebagai senyawa yang berpotensi sebagai antikanker dengan cara proliferasi sel kanker. Senyawa antosian menyebabkan penangkapan siklus sel melalui upregulasi p53, menstabilkan dan mengaktifkan gen penekan tumor p53, menurunkan regulasi ekspresi Bcl-2, dan protein anti kematian Bcl-XL, serta mendukung induksi apoptosis melalui aktivasi aktivitas caspase-3, caspase-8, caspase-9 dan sitokrom-c (cyt-c) kondisi tersebut terjadi dalam uji sitotoksik (Yuliasri *et al.*, 2022). Aktivitas ini memiliki

potensi untuk meningkatkan efek antitumor Doxorubicin dan mengurangi mekanisme resistensi yang umum terjadi.

Berdasarkan hal tersebut maka mendasari peneliti untuk melakukan penelitian pengembangan ko-kemoterapi atau kombinasi terapi Ekstrak Etanol Bunga Rosella dengan Doxorubicin pada sel kanker serviks (HeLa). Tujuan dikombinasi adalah untuk menambah efektivitas pengobatan sebagai agen kemoterapi. Kombinasi obat pada ko-kemoterapi memiliki efek sinergisme terhadap sel kanker dan dapat menoleransi toksisitas menjadi lebih efisien daripada agen tunggal secara klinik. Oleh karena itu, sangat penting untuk merancang desain kombinasi yang sesuai untuk mencapai keuntungan yang optimal.

## **METODE PENELITIAN**

### **Alat**

Alat-alat yang digunakan yaitu *conical tube*, *counter*, *culture dish*, desikator, ELISA *plate reader* (Benchmark<sup>®</sup>), *hemocytometer* (Neubauer<sup>®</sup>), Inkubator CO<sub>2</sub> 5% (Heraeus<sup>®</sup>), *Laminar Air Flow* (LAF)

(Labconco<sup>®</sup>), mikropipet (Gilson<sup>®</sup>), *microplate 96-well* (IWAKI<sup>®</sup>), mikroskop *inverted* (Olympus<sup>®</sup>), oven, *rotary evaporator* (Heidolph<sup>®</sup>), timbangan analitik (Sartorius<sup>®</sup>), Tip 100  $\mu$ L dan 1000  $\mu$ L, serta *vortex* (Barnstead<sup>®</sup>).

### **Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan yaitu ekstrak bunga Rosella yang diperoleh melalui proses maserasi dengan menggunakan etanol 96% sebagai pelarut (CV. Herbal Anugrah Alam Yogyakarta), etanol 96%, Doxorubicin, sel kanker serviks (HeLa) dan sel Vero, FBS (Fetal Bovine Serum) 10%, FBS 0,5%, Media Kultur Medium RPMI (Rosewell Park Memorial Institute) 1640 (Gibco), media kultur Medium 199 (Gibco), Tripsin EDTA 0,25%, PBS (Phosphat Buffer Saline), Fungison (Gibco), Penisilin Streptomisin 1% v/v, aqua bidestilata, etanol 70%, Natrium bikarbonat, HEPES (N-2-Hidroxy Ethyl Piperazine-N-Ethane Sulfonic acid), Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) 10% dalam HCl 0,01 N, DMSO 0,5%, antibody p53, antibodi Bcl-2, dan antibodi caspase-3(sigma).

### **Pembuatan Larutan Stok**

Ekstrak etanol bunga Rosella sebanyak 100 mg dilarutkan dalam 100  $\mu$ L DMSO dan secara terpisah, 1 gram Doxorubicin juga dilarutkan dalam 100  $\mu$ L DMSO kemudian ditambahkan media (RPMI 1640 untuk sel kanker serviks (HeLa). Lalu dari larutan stok tersebut akan dibuat seri (1000; 500; 250; 125)  $\mu$ g/mL (untuk Ekstrak Etanol Bunga Rosella), dan larutan dengan seri kadar (100; 50; 25;12,5)  $\mu$ g/mL (untuk Doxorubicin). Kabinet LAF adalah area yang ditunjuk untuk persiapan aseptik larutan stok perawatan dan rangkaian konsentrasi (Rahardhian *et al.*, 2018).

### **Pembuatan Media Biakan dan**

#### **Media Penumbuh Sel**

Media kultur dibuat sesuai dengan protokol standar menggunakan RPMI 1640, NaHCO<sub>3</sub>, dan HEPES, kemudian disesuaikan pH-nya hingga mencapai pH 7.2 - 7.4. Larutan selanjutnya diaduk hingga mencapai konsistensi yang seragam, kemudian diatur pHnya menjadi 7,2 - 7,4 menggunakan pH meter dengan menambahkan HCl 1 N sebagai buffer. Setelah itu, cairan menjalani

filtrasi aseptik menggunakan filter polietilen sulfon 0,2 mikrometer steril. Media pertumbuhan sel dibuat dengan menggabungkan 30,0 mL serum janin sapi (FBS) 10%, 1,5 mL fungison, dan 3,0 mL penstrep dengan media hingga tercapai volume total 100,0 mL. Selanjutnya cairan disaring secara aseptik menggunakan filter polietilen sulfon 0,2 mikrometer (Husna, 2023).

### **Preparasi Sel HeLa**

#### **Pengaktifan sel HeLa**

Setelah mengeluarkan sel HeLa dari tangki nitrogen cair, sel tersebut segera dibiarkan mencair. Setelah ampul disemprot dengan larutan etanol 70% untuk sterilisasi, ampul tersebut dimasukkan ke dalam lemari *Laminar Air Flow* (LAF). Sel dipindahkan dari ampul ke tabung krio aseptik baru yang berisi media kultur sebelum dibuka segelnya. Setelah mensentrifugasi suspensi sel pada 600 rpm selama 5 menit, cairan yang naik di atas sedimen dibuang. Media kultur segar dimasukkan ke dalam endapan sel dan diaduk perlahan hingga terdistribusi secara merata. Sel dikultur dalam beberapa cawan kultur jaringan dan

ditempatkan dalam inkubator CO<sub>2</sub> pada suhu 37°C dengan laju aliran CO<sub>2</sub> 5%. Setelah jangka waktu dua puluh empat jam, media kultur diganti, dan sel dikultur hingga mencapai cakupan lengkap dan jumlah yang sesuai untuk penyelidikan lebih lanjut. Setelah sel mencapai pertemuan, media dikeluarkan dan sel dibilas dengan PBS dua kali. Sel-sel diberi trypsin 0,25% untuk memisahkannya dari cawan kultur jaringan dan kemudian ditempatkan dalam inkubator CO<sub>2</sub> selama 3 menit. Media dimasukkan ke dalam cawan kultur jaringan, dan sel diaduk hingga benar-benar terlepas dari dinding cawan. Selanjutnya suspensi sel dipindahkan ke *cryotube* segar yang telah disterilkan. Perhitungan sel dilakukan dengan menggunakan hemositometer dan penghitung sel. Selanjutnya dibuat suspensi sel dengan konsentrasi sel yang memenuhi standar yang ditentukan (Husna, 2023).

#### **Panen sel HeLa**

Sel-sel dikikis dari dinding labu ketika jumlah sel yang dibutuhkan telah diperoleh, dan 5 ml medium

spesifik ditambahkan ke medium lama. Tabung kerucut steril digunakan untuk menempatkan sel-sel, dan kemudian 10 mL medium ditambahkan. Ini diikuti dengan sentrifus selama 5 menit pada kecepatan 2000 rpm untuk tabung tersebut. Volume medium tertentu ditambahkan ke suspensi sel untuk mencapai konsentrasi sel  $2 \times 10^4$  sel/100  $\mu$ L. (Gaffar *et al.*, 2022).

### Uji Sitotoksitas

Penelitian ini telah mendapat persetujuan etik penelitian oleh KEP Universitas Ahmad Dahlan dengan nomor 012307117/2023. Pada uji sitotoksitas dilakukan dengan teknik MTT. Teknik MTT dilakukan dengan mengambil sel dari inkubator CO<sub>2</sub>, dilanjutkan dengan menilai keadaan sel. Kultur sel yang digunakan telah mencapai pertemuan 80% sebelum dipanen. Selanjutnya sel dikumpulkan dan diukur, dilanjutkan dengan pengenceran sel yang sesuai menggunakan media kultur lengkap (MK). Selanjutnya, sel-sel ditempatkan ke dalam *microplate 96-well*, dengan masing-masing sumur berisi  $5 \times 10^3$  sel, dan diinkubasi semalaman. Selanjutnya, sampel

dengan jumlah berbeda yang mengandung kosolven DMSO dimasukkan ke dalam sumur dan diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator 5% CO<sub>2</sub> selama 24 jam. Setelah masa inkubasi selesai, 100  $\mu$ L reagen MTT pekat (0,5 mg/ml) dalam DMEM dimasukkan ke dalam setiap sumur. Selanjutnya sampel diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 3 jam sehingga terbentuk formazan. Selanjutnya, keadaan sel diperiksa menggunakan mikroskop terbalik. Setelah formazan terlihat diproduksi, larutan yang mengandung 10% SDS *stopper* dalam 0,1 N HCl dimasukkan. Selanjutnya, piring tersebut sekali lagi dibungkus dengan kertas atau aluminium foil dan ditempatkan di lingkungan tanpa cahaya sepanjang malam. Absorbansi diukur menggunakan ELISA *Reader* pada panjang gelombang :  $\lambda$  595 nm (Gaffar *et al.*, 2022). Hasil pembacaan absorbansi pada sel hidup dikonversi dalam satuan % sel hidup dengan cara sesuai pada Persamaan 1.

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{\text{Abs Sel dengan perlakuan} - \text{Abs Kontrol media}}{\text{Abs Kontrol sel} - \text{Abs Kontrol Media}} \times 100\% \dots (1)$$

### Uji Antiproliferasi

Uji antiproliferasi dilakukan dengan mengambil 100  $\mu$ L sampel

media RPMI 1640 yang mengandung Rosella dengan konsentrasi 1000; 500; 250; 25 µg/mL dan Doxorubicin dengan konsentrasi 100 ; 50 ; 25 ; 12,5 µg/mL. Kemudian ditempatkan pada setiap sampel dalam *microplate 96-well* yang terpisah. Setelah itu,  $2 \times 10^4$  sel per sumur disemai ke dalam 100 µL suspensi sel.. Media diambil dari masing-masing sumur hingga sel-sel menempel pada dasar sumur. Setelah itu, 100 µL tripsin EDTA ditambahkan setelah sel dicuci dengan 100 µL PBS. Untuk mengetahui jumlah sel, sampel disuspensikan kembali selama sekitar tiga menit dan kemudian sebanyak sepuluh mikroliter (µL) dikeluarkan menggunakan *hemocytometer*. Penampakan sel yang mati akan tampak kusam dan kabur.

Uji antiproliferatif dilakukan pada konsentrasi yang lebih rendah dari konsentrasi mematikan dengan pengambilan sampel pada waktu 24, 48, dan 72 jam. Waktu penggandaan sel (*doubling time*).

Grafik yang menggambarkan korelasi antara durasi inkubasi (diukur dalam jam) dan jumlah sel yang hidup dibuat, diikuti dengan

penentuan persamaan regresi linier. Nilai waktu penggandaan ditentukan dengan membuat grafik yang menggambarkan korelasi antara waktu yang diperlukan sel untuk menetas dan logaritma jumlah sel hidup. Grafik ini memungkinkan kita menghasilkan persamaan regresi linier dalam bentuk  $Y = Bx + A$ . Y mewakili logaritma dua kali jumlah awal sel hidup, sedangkan X mewakili besarnya waktu penggandaan (Wati *et al.*, 2016). Adapun perhitungan *doubling time* dihitung dengan rumus dari Persamaan 2.

$$\text{Doubling time} = \frac{Y-A}{B} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

Keterangan:

Y = log (2x jumlah sel hidup awal);

A = Intersep;

B = Slope

#### **Uji *Combination Index* (CI)**

Uji *combination index* (CI) dilakukan dengan menggunakan sampel Doxorubicin dan Ekstrak Etanol Bunga Rosella. Pengujian bergantung pada hasil IC<sub>50</sub>, yang kemudian digabungkan dengan konsentrasi IC<sub>50</sub> dari sampel soliter. Absorbansi digunakan untuk mengukur jumlah sel yang layak

berdasarkan dampak sampel soliter, yang selanjutnya ditentukan menggunakan perhitungan indeks komposit. Nilai  $D_x$  mewakili konsentrasi  $IC_{50}$  zat yang terpisah, sedangkan  $D_1$  dan  $D_2$  mewakili konsentrasi kombinasi yang mempunyai efek yang sama dengan konsentrasi individu (Marianne *et al.*, 2018). Uji *combination Index* (CI) dihitung menggunakan Persamaan 3.

$$CI = \frac{(D)1}{(DX)1} + \frac{(D)2}{(DX)2} \dots\dots\dots (3)$$

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Uji Sitotoksik**

Pendekatan penghitungan sel dilakukan langsung di bawah mikroskop dengan menggunakan hemositometer. Uji sitotoksik dilakukan untuk menilai efek berbagai konsentrasi Ekstrak Etanol Bunga Rosella (1000; 500; 250; 125  $\mu\text{g/mL}$ ) yang dikombinasikan dengan Doxorubicin (100; 50; 25; 12.5  $\mu\text{g/mL}$ ). Menambahkan reagen MTT pada sampel dan kontrol akan menghasilkan perkembangan warna ungu, yang menunjukkan adanya sel yang hidup. Intensitas warna ungu yang lebih besar berhubungan dengan peningkatan serapan, yang

menunjukkan populasi sel yang dapat hidup lebih besar.

Hasil yang disajikan pada Tabel 1. menunjukkan korelasi positif antara konsentrasi zat uji yang diberikan pada suspensi sel dan persentase kematian sel yang dihasilkan. Nilai  $IC_{50}$  yang mewakili konsentrasi obat yang diperlukan untuk menghambat 50% proses seluler secara *in vitro*, dihitung dengan metode analisis probit. Salah satu jenis analisis regresi, analisis probit digunakan untuk mengetahui korelasi antara dosis dan persentase kematian sel. Nilai  $IC_{50}$  mengklasifikasikan aksi sitotoksik ekstrak terhadap sel kanker menjadi empat kelompok, menurut penelitian Gusungi (2020), sangat aktif jika  $IC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ , aktif jika  $IC_{50} 10-100 \mu\text{g/mL}$ , cukup aktif jika  $IC_{50} 100-500 \mu\text{g/mL}$ , dan kurang aktif jika nilai  $IC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$ . Perhitungan  $IC_{50}$  dilakukan menggunakan perangkat lunak GraphPad Prism, dengan metode analisis non-linear regression untuk menghasilkan nilai  $IC_{50}$  dari data absorbansi yang diperoleh menghasilkan hasil sebesar 32,3

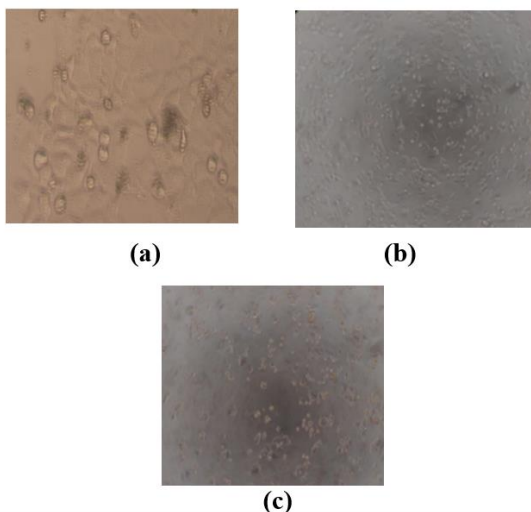
$\mu\text{g/mL}$ .  $\text{IC}_{50}$  untuk doxorubisin ditentukan sebesar  $2,67 \mu\text{g/mL}$ , dengan tingkat kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ). Dengan kata lain, pada konsentrasi tersebut, sampel uji Ekstrak Etanol Bunga Rosella mampu menghambat proliferasi sel HeLa sebesar 50%, menunjukkan adanya

aktivitas sitotoksik terhadap kategori aktif karena berada pada rentang  $\text{IC}_{50}$  10-100  $\mu\text{g/mL}$ .

Pada Gambar 1. menampilkan hasil perbandingan morfologi sel HeLa dengan sel kontrol, serta efek pemberian Ekstrak Etanol Bunga Rosella dan Doxorubicin.

**Tabel 1.** Hasil Uji Sitotoksik Rosella dan doxorubcin tunggal

Zat Aktif	Regresi Linear	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rata-rata $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Rosella	$y = -41,791x + 153$	$29,1 \pm 2,15$	$32,3 \pm 2,15$
	$y = -41,297x + 154,01$	$33,0 \pm 2,15$	
	$y = -43,646x + 160,1$	$33,3 \pm 2,15$	
	$y = -45,758x + 165,72$	$33,8 \pm 2,15$	
Doxorubicin	$y = -23,478x + 115,97$	$2,80 \pm 0,09$	$2,67 \pm 0,09$
	$y = -25,741x + 118,75$	$2,67 \pm 0,09$	
	$y = -27,008x + 119,8$	$2,58 \pm 0,09$	
	$y = -24,626x + 114,57$	$2,62 \pm 0,09$	



**Gambar 1.** Morfologi sel HeLa dalam sumuran dengan mikroskop perbesaran  $40 \times 10$ , (a) kontrol, (b) pemberian perlakuan Ekstrak Etanol Bunga Rosella, (c) pemberian perlakuan Doxorubicin.

IC50 menunjukkan konsentrasi sampel yang diperlukan untuk menghambat 50% pertumbuhan sel. Nilai IC50 yang lebih rendah mengindikasikan aktivitas sitotoksik yang lebih kuat. Data disajikan sebagai rata-rata  $\pm$  standar deviasi dari empat percobaan independent

### Hasil Uji Sitotoksik *Combination Index* (CI)

Setelah dilakukan penentuan nilai IC<sub>50</sub> untuk Rosella dan Doxorubicin, selanjutnya dilakukan uji sitotoksik gabungan. Konsentrasi yang digunakan untuk pengujian sitotoksik gabungan ditentukan dengan mengalikan temuan IC<sub>50</sub> yang diperoleh sebelumnya. Nilai IC<sub>50</sub> Ekstrak Etanol Bunga Rosella. Setelah pemberian MTT dan *stopper*, sumur diinkubasi dalam lingkungan gelap pada suhu kamar selama satu malam. Absorbansi diukur menggunakan ELISA *Reader*, dan data yang dihasilkan diolah hingga diperoleh kombinasi hasil indeks. Adapun data hasil Uji Sitotoksik *Combination Index* (CI) dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Hasil Uji Sitotoksik *Combination Index* rosella dan Doxorubicin (Sel HeLa)

		Doxorubicin ( $\mu$ M)				
Rosella	Conc.	2,67	1,34	0,67	0,33	
		32,3	6,93	333,34	1,60	1,18
		16,15	0,0054	5,069	5,71	49,34
		8,08	7,63	11,33	16,84	1,158
		4,04	<b>0,0013</b>	6,959	34,96	1,150

Hasil dari 16 percobaan uji sitotoksik yang mengevaluasi kombinasi Ekstrak Etanol Bunga Rosella dan Doxorubicin menghasilkan kisaran nilai indeks kombinasi, yang menunjukkan spektrum efek dari sinergis yang sangat kuat.

Nilai CI sebesar 1 menunjukkan kinerja aditif antara dua kombinasi sampel. Nilai CI<1 menunjukkan adanya efek sinergis yang sangat kuat, sedangkan nilai CI>1 menunjukkan adanya efek antagonistik. Investigasi tersebut menghasilkan nilai indeks kombinasi (CI) sebesar 0,0013, yang menunjukkan adanya dampak sinergis yang sangat kuat. Hal ini didukung dengan nilai CI (0,0013<1) yang dianggap sebagai nilai optimal.

Efek sinergis diamati antara Ekstrak Etanol Bunga Rosella dengan dosis 4,04  $\mu$ g/mL dan Doxorubicin pada konsentrasi 2,67  $\mu$ g/mL. Secara

teoritis, efek sinergis ini memungkinkan pengurangan dosis Doxorubicin yang diperlukan untuk mencapai efek terapeutik yang sama. Hal ini berpotensi mengurangi efek samping yang sering dikaitkan dengan penggunaan Doxorubicin, seperti kardi toksisitas, tanpa mengorbankan efikasi pengobatan. Selain itu, kombinasi ini juga dapat membantu mengatasi resistensi obat yang sering muncul dalam pengobatan kanker serviks dengan Doxorubicin tunggal. Meskipun demikian, perlu dicatat bahwa hasil *in vitro* ini masih memerlukan validasi lebih lanjut melalui studi *in vivo* dan uji klinis untuk mengkonfirmasi keamanan dan efektivitasnya pada pasien kanker serviks.

### Hasil Uji Antiproliferasi

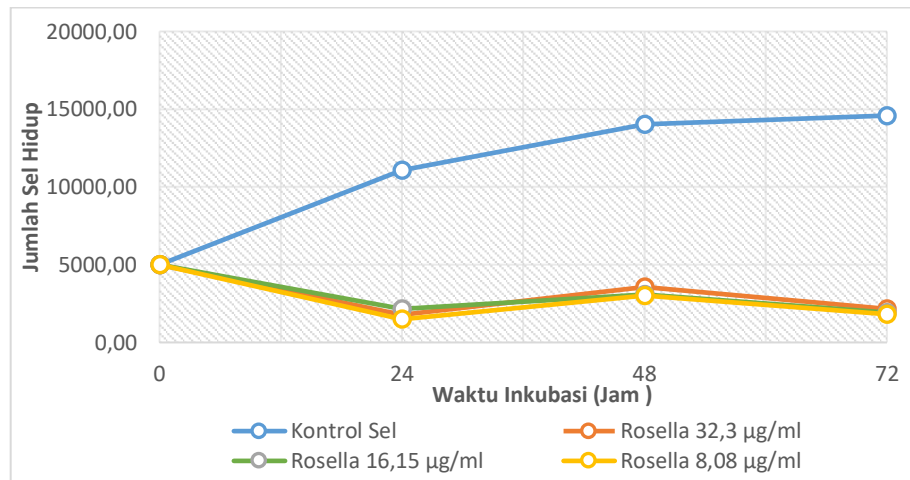
Efek antiproliferatif sampel pada

sel HeLa dievaluasi pada 24, 48, dan 72 jam setelah injeksi. Pewarnaan dengan Annexin V biasanya digunakan untuk membedakan sel-sel apoptosis awal dan akhir. Sel yang membrannya utuh tahan terhadap pewarnaan PI (*Propidium Iodide*), namun sel dengan membran yang mati atau rusak memungkinkan pewarnaan PI menembus (Sul'ain *et al.*, 2019).

Hasil uji waktu penggandaan yang diperoleh dari penerapan Ekstrak Etanol Bunga Rosella pada sel HeLa disajikan pada Tabel 3. Hasil tersebut diperoleh dari persamaan regresi linier. Selain itu, data direpresentasikan secara visual pada Gambar 2. di mana waktu inkubasi diplot terhadap logaritma jumlah sel hidup.

**Tabel 3.** Hasil Uji *doubling time* Ekstrak Etanol Bunga Rosella terhadap Sel HeLa berdasarkan persamaan regresi linear.

Perlakuan	Persamaan		R	<i>Doubling Time</i> (jam)
	<i>Slope</i> (B)	<i>Intercept</i> (A)		
32,3 µg/mL	-0,0798	3,65	0,9953	53,23
16,15 µg/mL	-0,1183	3,73	0,9809	39,02
8,08 µg/mL	-0,0926	3,64	0,9757	46,74
Kontrol Sel	-0,1052	3,75	0,9345	28,53



**Gambar 2.** Grafik hubungan log jumlah sel hidup dengan waktu inkubasi pada uji doubling time untuk sampel dengan kadar Ekstrak Etanol Bunga Rosella 32,3; 16,15; 8,08 µg/ml dibandingkan dengan kontrol sel.

Tujuan uji antiproliferasi adalah untuk memastikan potensi kombinasi Ekstrak Etanol Bunga Rosella dan Doxorubicin dalam menghambat proliferasi sel. Pengumpulan data terjadi pada tiga interval waktu: 24, 28, dan 72 jam. Akibatnya, bahan kimia uji yang digunakan berada pada tiga konsentrasi lebih rendah dari  $IC_{50}$ , memastikan bahwa sejumlah besar sel tetap bertahan selama periode pengamatan 72 jam. Pada uji antiproliferasi, sel dipuasakan (*starvation*) untuk jangka waktu satu hari dalam media kultur yang mengandung FBS, yang kaya akan nutrisi penting untuk pertumbuhan sel. Akibatnya, penurunan jumlah FBS di media menyebabkan penurunan

pertumbuhan sel (Rahardhian *et al.*, 2018).

Untuk mengevaluasi efek antiproliferatif Ekstrak Etanol Bunga Rosella dan Doxorubicin, dilakukan analisis nilai serapan Ekstrak Etanol Bunga Rosella pada konsentrasi 32,3 µg/mL, 16,15 µg/mL, dan 8,08 µg/mL. Absorbansi sel kontrol dibandingkan dengan sel yang diberi perlakuan. Teramati bahwa sel kontrol mempunyai waktu penggandaan serapan yang lebih cepat yaitu 28,53 jam, sedangkan perlakuan pada konsentrasi 32,3 µg/mL mempunyai waktu penggandaan yang lebih lambat. Durasi pembelahan sel meningkat hingga maksimum 53,23 jam bila konsentrasinya 16,15 µg/mL. Pada

dosis 8,08  $\mu\text{g/mL}$ , waktu yang diperlukan untuk pembelahan sel adalah 46,74 jam. Hal ini menunjukkan bahwa injeksi ekstrak etanol yang berasal dari Bunga Rosella dapat memperpanjang waktu yang dibutuhkan sel untuk menggandakan diri dan menurunkan jumlah sel yang hidup dibandingkan dengan sel kontrol. Temuan penelitian ini menunjukkan bahwa Ekstrak Etanol Bunga Rosella mempunyai efek penghambatan terhadap proliferasi sel, dibuktikan dengan tertundanya waktu penggandaan. Tingkat penundaan ini tergantung pada dosis ekstrak yang diberikan. Ada korelasi langsung antara jumlah ekstrak dan penekanan pertumbuhan sel. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa Ekstrak Etanol Bunga Rosella mempunyai efek antiproliferasi dengan menyebabkan penundaan periode penggandaan sel. Kandungan antosianin Bunga Rosella dapat mengaktifkan caspase-3 melalui sitokrom-c, seperti yang ditunjukkan pada penelitian Dona *et al.*, (2016), Sehingga sel HeLa yang mati, disebabkan oleh mekanisme

penangkapan (siklus sel ditahan). Biasanya, pada G1/S dan G2/M, mengalami apoptosis terlebih dahulu atau segera mengalami apoptosis.

Berdasarkan data hasil penelitian terdapat perbedaan hasil efektivitas antara sampel tunggal dan sampel kombinasi. Nilai *output pair* 1 diperoleh nilai Sig. (2-tailed) sebesar  $0,000 < 0,005$ , maka dapat disimpulkan terdapat perbedaan rata-rata hasil sampel pembanding (Doxorubicin) terhadap sampel uji (Rosella) berbeda signifikan ( $p < 0.05$ ). Hasil uji probabilitas dan normalitas berdasarkan sebaran data *doubling time* terhadap sampel (Rosella) dan (Doxorubicin) menyatakan sebaran data *doubling time* terdistribusi normal ( $p \text{ value} > 0.05$ ) yang artinya analisa data dengan probabilitas (Sig.) 0,000, dengan data tersebut maka dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara sebelum di kombinasi dan sesudah di kombinasi.

Mekanisme molekul antosianin dalam menginduksi apoptosis pada sel kanker serviks melibatkan beberapa jalur signaling. Setelah

berkembang sempurna, antosianin dapat mengaktifkan caspase-3 melalui transfer sitokrom-c dari mitokondria ke sitosol. Selain itu, antosianin memiliki kemampuan untuk menekan ekspresi protein pro-apoptosis seperti Bax dan meningkatkan ekspresi protein anti-apoptosis seperti Bcl-2. Hal ini menyebabkan permeabilisasi membran mitokondria dan degradasi faktor apoptosis. Selain itu, dilaporkan bahwa antosianin dapat menghambat NF- $\kappa$ B, faktor transkripsi yang terlibat dalam proliferasi sel dan resistensi apoptosis. Menggabungkan efek pro-apoptosis ini dengan mekanisme kerja Doxorubicin, yang meningkatkan kerusakan oksidatif DNA melalui interkalasi dan degradasi topoisomerase II, menghasilkan efek sinergis yang kuat yang menghambat pertumbuhan sel kanker serviks.

Kombinasi Ekstrak Etanol Bunga Rosella dan Doksorubisin memiliki masa depan yang sangat menjanjikan. Kombinasi ini tidak hanya memiliki kemampuan untuk meningkatkan efektivitas pengobatan, tetapi juga memiliki potensi untuk menurunkan

dosis doksorubisin yang diperlukan, yang dapat mengurangi efek samping yang sering terjadi ketika doksorubisin digunakan secara topikal. Namun, penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengoptimalkan dosis dan memastikan keamanan kombinasi ini secara *in vivo*. Langkah-langkah penelitian lebih lanjut meliputi uji model hewan, studi farmakokinetik untuk memahami interaksi obat herbal, dan studi fase klinis awal untuk menilai efisiensi dan kesejahteraan manusia.

## **KESIMPULAN**

Penelitian ini dapat disimpulkan bahwa Ekstrak Etanol bunga Rosella (*H. sabdariffa*. L) mempunyai sifat sitotoksik dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 32,3  $\mu$ g/mL dan  $IC_{50}$  Doxorubicin sebesar 2,67  $\mu$ g/mL. Ekstrak ini mempunyai efek antiproliferasi dengan menyebabkan penundaan waktu penggandaan atau *doubling time*, hal ini ditunjukkan pada hasil yang diperoleh pada kontrol sel nilai *doubling time*  $28,25 \pm 0,21$  jam sedangkan konsentrasi Ekstrak Etanol Bunga Rosella pada kadar 32,3;

16,15; dan 8,08  $\mu\text{g/mL}$  diperoleh nilai *doubling time*  $53,23 \pm 0,20$  jam,  $39,02 \pm 0,19$  jam dan  $46,74 \pm 0,23$  jam sehingga menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan penggandaan sel. Nilai indeks kombinasi Ekstrak Etanol Bunga Rosella ( $4,04 \mu\text{g/mL}$ ) dengan Doxorubicin ( $2,67 \mu\text{g/mL}$ ) dapat diinterpretasikan adanya efek sinergis sangat kuat dengan nilai CI terbaik ( $0,0013 < 1$ ). Hasil ini menunjukkan bahwa efek sitotoksik kombinasi bunga Rosella dan Doxorubicin lebih besar dibandingkan penjumlahan masing-masing efek pemberian senyawa tunggal.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Direktorat Riset, Teknologi dan Pengabdian kepada Masyarakat, Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset dan Teknologi atas pemberian hibah dalam penelitian ini dengan nomor kontrak 008/PFRLPPM UAD/VI/2023.

#### DAFTAR PUSTAKA

Aina, T., Akpe, V., Magbagbeola, O., Cock, I.E., 2021, Anti-

- proliferative Activity of *Hibiscus sabdariffa* L. Calyx Flavonoid Extracts on Cervical Cancer Cells using Flow Cytometry, *Pharmacognosy Communications*; 11(2): 88–94.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2022, National Breast and Cervical Cancer Early Detection Program (NBCCEDP), <https://www.cdc.gov/breast-cervical-cancer-screening/index.html> was accessed on October 31, 2022.
- Dona, R., Sulistyani, N., & Nurani, L. H. (2016). Uji sitotoksitas dan antiproliferatif ekstrak etanol daun leunca (*Solanum nigrum*, L.) terhadap sel raji. *Pharmaciana*, 6(2), 181-190.
- Gadducci, A., Barsotti, C., Cosio, S., Domenici, L., & Genazzani, A. R. (2020). Smoking habit, immune suppression, oral contraceptive use, and hormone replacement therapy use and cervical carcinogenesis: a review of the literature. *Gynecological Endocrinology*, 27(8), 597–604. <https://doi.org/10.3109/09513590.2011.558953>
- Gaffar, S., Nugraha, M.Y., Hafiz, E., Wiraswati, H.L., Herlina, T., 2022, Aktivitas Antioksidan dan Sitotoksik Terhadap Sel Kanker HeLa dari Ekstrak Daun Vernonia amygdalina (Asteraceae), *Chimica et Natura Acta*; 10(1): 6-14.
- Gusungi, D. E., Maarisit, W., Hariyadi, H., & Potalangi, N. O. (2020). Studi Aktivitas

- Antioksidan Dan Antikanker Payudara (Mcf-7) Ekstrak Etanol Daun Benalu Langsung Dendrophthoe Pentandra. *Biofarmasetikal Tropis*, 3(1), 166-174.
- Husna, H. N., 2023, Efek Sitotoksik Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum Sanctum*) terhadap Sel HeLa (Sel Kanker Serviks), *Dissertation*, Universitas Islam Sultan Agung, Semarang.
- Mamat, N., Abdullah, H., Hapidin, H., Fatmawati, N., 2021, Combination effect of cisplatin and gallic acid on apoptosis and antioxidant enzymes level in cervical cancer (HeLa) cells, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*; 11(3): 92-99.
- Marianne, M., Patilaya, P., Barus, B. T., 2018, Uji Aktivitas Antioksidan Kombinasi Ekstrak Etanol Rimpang Temu Giring (*Curcuma Heyneana*) dan Daun Pugun Tanoh (*Curanga Fel-Terrae*) Menggunakan Metode Diphenyl Picrylhydrazil (DPPH), *Talenta Conference Series: Tropical Medicine (TM)*; 1(2): 398-404.
- Matyszewska, D., Nazaruk, E., Campbell, R.A., 2021, Interactions of anticancer drugs Doxorubicin and idarubicin with lipid monolayers: New insight into the composition, structure and morphology, *J Colloid Interface Sci*; 581: 403–16.
- Novalia, V., 2023, Kanker Serviks, *Galenical: Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Mahasiswa Malikussaleh*; 2(1): 45-56
- Rahardhian, M. R. R., & Utami, D. (2018). Uji SITOTOKSIK DAN ANTIPROLIFERASI EKSTRAK ETER DAUN BINAHONG (*Andredera cordifolia* (Tenore) Steen.) TERHADAP SEL HeLa. *Media Farmasi Indonesia*, 13(1).
- Sul'ain, M.D., Zakaria, F., Johan, M.F., 2019, Anti-proliferative effects of methanol and water extracts of *Pyrrosia piloselloides* on the hela human cervical carcinoma cell line, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*; 20(1): 185–192. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.1.185>
- The Global Cancer Observatory, 2021, The Global Cancer Observatory – Indonesia, <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/360-indonesia-fact-sheet.pdf> was accessed on 2024.
- Volkova, M., & Russell, R., 3rd. (2011). Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. *Current Cardiology Reviews*, 7(4), 214-220.
- Wang, X., Wang, H., Mou, X., Xu, Y., Han, W., Huang, A., Li, Y., Jiang, H., Yang, X., Hu, Z., 2022, Lysophosphatidic acid protects cervical cancer HeLa cells from apoptosis induced by Doxorubicin hydrochloride, *Oncology Letters*; 24(2): 267-275.
- Wati, E.M., Puspaningtyas, A.R., Pangaribowo, D.A., 2016, Uji

Sitotoksitas dan Proliferasi Senyawa 1-(4-nitrobenzoioksi-metil)-5-fluorourasil terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7 methyl)-5-fluorouracil) on Breast Cancer Cells MCF-7), *Pustaka Kesehatan*; 4(3):484–488.

World Health Organization (WHO), 2022, Cervical Cancer, [https://www.who.int/health-](https://www.who.int/health-topics/cervical-cancer)

[topics/cervical-cancer](https://www.who.int/health-topics/cervical-cancer) was accessed on September 12, 2024. Yuliastri, W.O., Diantini, A., Ghozali, M., Sahidin, I., Isrul, M., 2022, Phytochemical Constituent And In-Vitro Cytotoxic Activity Of *Hibiscus Sabdariffa* L. Calyx Fraction On Human Breast Cancer Cell Line MDA-MB-231, *Cell*; 15(3): 1619-1625.