

Aktivitas sitotoksik dan antiangiogenesis umbi mentimun papasan (*Coccinia grandis* L. Voight) terhadap sel kanker hela yang diinduksi protein bFGF

Julia Megawati Djamal^{1*}, Jason Merari P¹, Rizal Maarif Rukmana²

¹Program Studi Pascasarjana, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi, Surakarta, Jawa Tengah, Indonesia, 57127

²Departemen of Medical Laboratory Teknologi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Setia Budi, Surakarta, Jawa Tengah, Indonesia

*Email korespondensi: juliamegawatidjamal.08@gmail.com

Accepted: 07 Januari 2020; revision: 28 April 2020; published: 30 Juni 2020

Abstrak

Latar Belakang: Kanker leher rahim merupakan salah satu kanker yang paling sering terjadi pada wanita. Salah satu tanaman yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai alternatif pengobatan kanker adalah tanaman umbi mentimun papasan (*C. grandis* (L.) Voight). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker Hela dan antiangiogenesis terhadap *chorioallantoic membrane* (CAM).

Metode: Umbi mentimun papasan yang diekstraksi dengan pelarut etanol 96%. Ekstrak etanol kemudian dilanjutkan dengan fraksinasi dengan metode partisi cair-cair dilanjutkan dengan kromatografi lapis tipis. Uji aktivitas sitotoksik dilakukan dengan menggunakan metode *Microculture Tetrazolium Salt* (MTT) dan uji antiangiogenesis dilakukan dengan menggunakan metode CAM embrio ayam yang terinduksi dengan protein bFGF.

Hasil: Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air memiliki nilai IC_{50} berturut-turut 986,604 $\mu\text{g/ml}$, 208,776 $\mu\text{g/ml}$, 187,824 $\mu\text{g/ml}$ dan 553,393 $\mu\text{g/ml}$. Nilai IC_{50} dari fraksi *n*-heksan kemudian dilanjutkan dengan pengujian antiangiogenesis. Dari analisa KLT diperoleh hasil bahwa fraksi *n*-heksan mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tannin, saponin dan terpen. Hasil uji antiangiogenesis menunjukkan bahwa kemampuan pengobatan pada konsentrasi 104 $\mu\text{g/ml}$ yaitu 17,56%, pada konsentrasi 208 $\mu\text{g/ml}$ 43,23% dan pada konsentrasi 418 $\mu\text{g/ml}$ 56,78%.

Kesimpulan: Fraksi *n*-heksan dan fraksi etil asetat memiliki aktivitas sitotoksik yang sedang terhadap sel kanker Hela dan fraksi *n*-heksan memiliki aktivitas antiangiogenesis.

Kata kunci: angiogenesis, *C. grandis* (L.) Voight, *Chorioallantoic Membrane*, hela, sitotoksik

Abstract

Background: Cancer is one of the most common cancers in women. One of the plants that has the potential to be developed as an alternative treatment for cancer is the papasan cucumber tuber *C. grandis* (L.) Voight. This study aims to determine the activity of cytotoxic effects on Hela cancer cells and antiangiogenesis against *chorioallantoic membrane* (CAM).

Method: In this study, papasan cucumber tubers were extracted with 96% ethanol solvent. The ethanol extract was then continued with fractionation by ECC method, followed by KLT. Cytotoxic activity tests were carried out using the MTT method and antiangiogenesis tests were carried out using CAM methods of chicken embryos induced with bFGF protein.

Results: The results showed that the extract, *n*-hexane fraction, ethyl acetate fraction and water fraction had IC_{50} values 986,604 $\mu\text{g/ml}$, 208,776 $\mu\text{g/ml}$, 187,824 $\mu\text{g/ml}$ and 553,393 $\mu\text{g/ml}$. The IC_{50} value of the *n*-hexane fraction was then continued with antiangiogenesis testing. The KLT analysis showed that the *n*-hexane fraction contained alkaloids, flavonoids, tannins, saponins, and terpenes. Antiangiogenesis test result show that the inhibitory at concentration of 104 $\mu\text{g/ml}$ was 17,56%, at a concentration of 208 $\mu\text{g/ml}$ 43,23% and at a concentration of 418 $\mu\text{g/ml}$ 56,78%.

Conclusion: *n*-hexane fraction and ethyl acetate fraction have moderate cytotoxic activity against Hela cancer cells and *n*-hexane fraction has antiangiogenesis activity.

Key words: antiangiogenesis, *Chorioallantoic Membrane*, *Coccinia grandis* L. Voight, cytotoxic, hela

PENDAHULUAN

Kanker merupakan salah satu penyebab kematian terbanyak pada manusia dan kanker merupakan penyebab kematian tertinggi kedua diseluruh di seluruh Dunia pada tahun 2015¹. Tingginya kasus kanker baru dan angka kematian akibat kanker yang dapat disebabkan oleh faktor resiko perilaku dan pola makan. Faktor-faktor tersebut adalah indeks massa tubuh yang tinggi, kurangnya konsumsi sayur dan buah, kurangnya aktivitas fisik, merokok dan konsumsi alkohol yang berlebihan². Menurut *American Cancer Society* pada tahun 2014 terdapat 4.020 kematian akibat kanker serviks, dan 12.360 kasus kanker diharapkan dapat diatasi³. Kanker leher Rahim atau serviks adalah penyakit yang disebabkan oleh proses keganasan yang terjadi pada serviks atau mulut Rahim. *Human Papilloma Virus* (HPV) telah diketahui sebagai penyebab terjadinya kanker serviks, yang dapat ditularkan melalui hubungan seksual, infeksi beberapa jenis virus, dan personal *hygiene*. Berbagai strategi terapi pengobatan kanker serviks telah dilakukan diantaranya dengan menggunakan terapi bedah, radioterapi, dan kemoterapi maupun kombinasi ketiganya, namun hasilnya relatif belum optimal.

Angiogenesis merupakan proses pembentukan pembuluh darah baru yang terjadi secara normal dan sangat penting dalam proses pertumbuhan dan perkembangan. Proses angiogenesis sebagai indikator adanya perubahan status sel kanker dari jinak menjadi ganas. Sel kanker diketahui bersifat maglina apabila berukuran lebih dari 2 mm³ ⁴. Salah satu pencarian senyawa sitotoksik dan antiangiogenesis yang berasal dari tanaman obat. Oleh karena itu, sangat perlu adanya penemuan obat baru yang mempunyai efek sitotoksik dan antiangiogenesis yang baik pada sel kanker Hela. Pemanfaatan bahan alam sebagai salah satu alternatif obat kanker telah banyak dieksplorasi, salah satunya tanaman mentimun papasan (*C. grandis* (L.) Voight)) merupakan tanaman keluarga *Curcubitacea* yang banyak dijumpai di Negara-negara tropis. Tanaman mentimun

papasan (*C. grandis* (L.) Voight), merupakan salah satu tanaman dari Nusa Tenggara Timur (NTT) yang secara empiris digunakan untuk mengobati demam pada anak, mengobati gatal-gatal pada kulit, dan juga untuk mengobati atau menurunkan gula darah. Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh⁵, Ekstrak etanolik umbi mentimun papasan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* dan *Staphylococcus aureus* dan hasil identifikasi golongan senyawa menunjukkan adanya golongan senyawa flavonoid, tanin, saponin, alkaloid dan polifenol.

Umbi mentimun papasan (*C. grandis* (L.) Voight) bersifat sitotoksik terhadap sel BSLT dengan nilai LC₅₀ 23-32 µg/mL⁶. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui aktivitas sitotoksik ekstrak, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air umbi mentimun papasan terhadap sel kanker Hela dan mengetahui nilai IC₅₀ yang memiliki aktivitas sitotoksik paling kuat, serta mengetahui aktivitas antiangiogenesis pada pembuluh darah CAM embrio ayam yang diinduksi protein bFGF.

METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret-November 2019 di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dan dilanjutkan di Laboratorium Stuktur dan Perkembangan Hewan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada.

Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah umbi mentimun papasan (*C. grandis* (L.) Voight) sel Hela CAM. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah umbi mentimun papasan (*C. grandis* (L.) Voight) yang diperoleh dari Kabupaten Malaka- Nusa Tenggara Timur (NTT) pada bulan Maret 2019.

Prosedur Penelitian

Pembuatan Serbuk Umbi Mentimun Papasan

Umbi mentimun papasan kemudian dicuci, dipotong kecil-kecil, dan dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 30-370C selama \pm 5 jam. Umbi mentimun papasan dihaluskan dengan cara diblender kering kemudian diayak menggunakan ayakan mesh hingga berbentuk serbuk kering.

Penentuan kadar air serbuk Umbi Mentimun Papasan

Penentuan kadar air dilakukan dengan menggunakan alat sterling-bidwell. Umbi mentimun papasan ditimbang sebanyak 20 gram kemudian dimasukkan ke dalam labu alas bulat pada ditambahkan xylene sebanyak 100 ml dan dipanaskan hingga tidak ada tetesan air lagi kemudian dilihat volume tetesan tadi dan dihitung kadarnya dalam satuan persen.

Pembuatan Ekstrak Etanolik Umbi Mentimun Papasan

Pembuatan ekstrak etanol dilakukan dengan metode maserasi. Sebanyak 500 g serbuk dimasukkan dalam wadah berwarna gelap ditambahkan 2,5 L etanol 96%. Selanjutnya direndam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk, kemudian didiamkan selama 18 jam. Maserat kemudian dipisahkan dengan cara disaring, dekantasi atau filtrasi. Proses penyaringan diulangi sekurang-kurangnya satu kali dengan jenis pelarut yang sama dan jumlah volume pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pada penyaringan pertama. Ekstrak yang diperoleh dipisahkan dengan vacum rotary evaporator (suhu dijaga pada 500C) sampai diperoleh ekstrak kental yang disebut ekstrak etanol.

Identifikasi Kandungan Golongan Senyawa Ekstrak Etanolik Umbi Mentimun Papasan

a. Flavonoid

Sebanyak 0,1 g ekstrak dimasukkan kedalam gelas piala kemudian ditambahkan 10 ml aquadest dipanaskan selama 5 menit sampai mendidih. Setelah itu disaring dan filtratnya digunakan sebagai larutan uji. Filtrat

dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan pita Mg, 1 ml HCL pekat dan 1 ml alkohol kemudian dikocok dengan kuat. Uji positif flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol.

b. Alkaloid

Sebanyak 0,1 gram sampel dilarutkan dalam 10 ml CHCl₃ (kloroform) dan 4 tetes NH₄OH kemudian disaring dan filtratnya dimasukkan kedalam tabung reaksi tertutup. Ekstrak CHCl₃ dalam tabung reaksi kemudian dikocok dengan ditambahkan 10 tetes H₂SO₄ 2 M, sampai terbentuk 2 lapisan. Lapisan asam yang berada diatas dipisahkan kedalam tabung reaksi yang lain dan ditambahkan pereaksi mayer yang menghasilkan endapan warna putih sedangkan penambahan peraksi dragendorff yang akan menimbulkan endapan warna merah jingga.

c. Fenol

Sejumlah 0,1 gram sampel diekstrak dengan 20 ml metanol 70 %. larutan dihasilkan diambil sebanyak 1 ml kemudian ditambahkan 2 tetes larutan FeCl₃ 5%. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau atau hijau kebiruan.

d. Saponin

Sebanyak 0,1 gram sampel dimasukkan kedalam gelas piala kemudian ditambahkan 10 ml air panas dan dididihkan selama 5 menit. Setelah itu disaring dan filtratnya digunakan sebagai larutan uji. Filtrate dimasukkan kedalam tabung reaksi tertutup kemudian dikocok selama kurang lebih 10 detik dan dibiarkan selama 10 menit, ditambahkan 1 ml HCL 2M. Adanya saponin ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil.

e. Tanin

Sebanyak 0,1 g ekstrak ditambahkan dengan 10 ml air panas, dididihkan selama 5 menit dan disaring. Sebagaimana filtrat yang diperoleh ditambahkan dengan larutan FeCl₃ 1%. Hasil positif ditunjukkan oleh terbentuknya warna hijau kehitaman.

f. Triterpenoid dan Steroid

Sebanyak 0,1 g sampel dilarutkan dengan metanol kemudian diuapkan di atas

waterbath. Filtrat digerus kemudian dilarutkan dengan 2 ml kloroform dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan dengan asetat anhidrat sebanyak 10 tetes, selanjutnya larutan ditetesi dengan H₂SO₄ pekat 3 tetes melalui dinding tabung reaksi. Jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan adanya triterpen, sedangkan munculnya warna hijau menunjukkan adanya steroid.

Fraksinasi Umbi Mentimun Papasan

Fraksinasi dilakukan dengan metode ECC, dengan cara ekstrak pekat etanol umbi mentimun papasan dilarutkan dalam air, disaring kemudian difraksinasi dengan n-heksan dalam corong pisah dengan perbandingan 1:1, dikocok secukupnya. Dibiarkan sampai terbentuk 2 lapisan yaitu lapisan n-heksan dan lapisan air. Perlakuan ini dilakukan 3x pengulangan sampai lapisan n-heksan terlihat jernih. Perlakuan untuk lapisan air ini dilakukan seperti perlakuan di atas, fraksinasi menggunakan pelarut etil asetat dengan perbandingan 1:1. Hasil fraksi n-heksan, fraksi etil asetat diuapkan dengan rotary evaporator dan fraksi air diuapkan di water bath. Sehingga didapatkan fraksi kental. Selanjutnya masing-masing fraksi pekat ditimbang sampai diperoleh berat konstan untuk meyakinkan bahwa pelarut telah menguap dan didiamkan selama ± 2 hari dengan ditutup aluminium foil yang dilubang.

Identifikasi Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Umbi Mentimun Papasan

a. Flavonoid

Fase gerak yang digunakan yaitu: heksan: etil asetat: asam formiat (6:4:0,2). Perbandingan yang digunakan Quersetin 10mg / 1ml etanol. Penampak noda: sitroborat. Kemudian dideteksi UV 254 dan 366 nm.

b. Alkaloid.

Fase gerak yang digunakan yaitu: Toluene: etil asetat: dietil amin (7:2:1). Perbandingan : Quinin 10 mg / 1 ml etanol.

Penampak noda: pereaksi dragendroff. Kemudian dideteksi UV 254 dan 366 nm.

c. Tanin.

Fase gerak yang digunakan: Etil asetat: asam formiat : toluene : air (6:1,5:3:0,5). Perbandingan: asam galat/tanin 10mg/1ml etanol. Penampak noda: pereaksi FeCl₃ 5%. Kemudian dideteksi UV 254 dan 366 nm.

d. Polifenol.

Fase gerak yang digunakan: kloroform : etil asetat:asam formiat (0,5:9:0,5). Penampak noda: pereaksi FeCl₃ 5%. Kemudian dideteksi UV 254 dan 366 nm.

e. Steroid dan triterpenoid

Fase gerak yang digunakan: n-heksan : etil asetat (93:7). Perbandingan: tymol 10mg / 1ml etanol. Penampak noda: anisaldehyd asam sulfat. Kemudian dideteksi UV 254 dan 366 nm.

Uji Aktivitas Sitotoksik

Sel Hela dan Sel Vero diperoleh dari Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Sel Hela dikultur dalam media Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) dan sel Vero dikultur dalam media Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM). Masing-masing ekstrak, dan fraksi-fraksi ditimbang 10 mg kemudian, dilarutkan dalam 10 µl dimethyl sulfoxide (DMSO) lalu divorteks selama 3 menit. Kemudian diambil 100 µL dan dimasukkan ke dalam microplate 96 sumuran yang telah berisi sel kanker Hela dalam media RPMI dengan pengenceran ekstrak, 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 µg/ml, dan fraksi n-heksan, etil asetat dan air, 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 µg/ml, ditambah dengan perbandingan Doxorubicin sebagai kontrol perbandingan. Selanjutnya plate diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi dimasukkan MTT sebanyak 100 µL setelah itu ditambahkan dengan Sodium Duodecyl Sulphate (SDS) sebanyak 100 µL dan diinkubasi selama semalam pada suhu kamar. Setelah itu dibaca serapannya dengan Eliza Reader dan dihitung nilai IC₅₀. Perlakuan untuk sel vero ini dilakukan seperti di atas.

Uji Angiogenesis

Indikator angiogenesis (bFGF) yang digunakan sebanyak 25 µg, dibuat stok konsentrasi 1 µg/ml menggunakan larutan PBS pH 7,5. Dosis bFGF yang diberikan untuk setiap CAM embrio ayam perlakuan terinduksi adalah 10 ng. Fraksi yang paling toksik ditimbang 10 mg dan dilarutkan dalam DMSO 0,8% sterilkan kemudian dibuat seri konsentrasi perlakuan. Larutan PBS 10 nM pH 7.5 + bFGF 10 ng + DMSO + fraksi yang paling toksik ditambahkan tepat di tengah paper disc steril. Paper disc yang telah termuat larutan senyawa uji diimplantasi ke CAM.

Telur ayam arab berembrio umur sembilan hari diberi tanda pada kerabang telur yang meliputi batas ruang udara, lokasi embrio dan daerah yang akan dibuat segiempat (jendela) berukuran 1x1 cm di atas embrio. Selanjutnya kerabang telur di atas embrio diiris dengan menggunakan gergaji (mini drill) untuk membuat jendela. bFGF dan fraksi diimplantasikan melalui paper disc. Subjek uji yang berupa telur dibagi dalam 5 kelompok dan setiap kelompok ada tiga ulangan, sebagai berikut: kelompok I adalah kelompok kontrol negatif tiga TAB dengan pemberian paper disc dan tiga TAB pemberian paper disc + pelarut DMSO 0,8%. Kelompok II adalah kelompok positif dengan pemberian paper disc + 10 ng bFGF. Kelompok III, IV dan V merupakan kelompok telur yang digunakan untuk melihat efek penghambatan fraksi umbi mentimun papasan dengan variasi konsentrasi $\frac{1}{2}$ IC₅₀, 1 IC₅₀, dan 2 IC₅₀ µg/ml. Setelah diberi perlakuan, kemudian telur diinkubasi pada suhu 39°C dan kelembapan relatif 60% selama 72 jam. Setelah itu telur dibuka dengan cara mengunting cangkang telur 2 bagian, kemudian CAM yang melekat pada cangkang dicuci dengan larutan isotonis NaCl, setelah itu dilakukan pengamatan CAM terdapat pembuluh darah dikoleksi pada buffer formalin.

HASIL

1. Hasil perhitungan rendemen serbuk umbi mentimun papasan

Hasil perhitungan rendemen serbuk umbi mentimun papasan pada tabel 1.

2. Hasil Pembuatan Ekstrak Etanolik Umbi Mentimun Papasan

Hasil pembuatan ekstrak etanolik umbi mentimun papasan dapat dilihat pada tabel 2.

3. Hasil Persentase Kadar Air

Hasil penetapan kadar air ekstrak umbi mentimun papasan dapat dilihat pada tabel 3.

4. Hasil Identifikasi Golongan Senyawa Ekstrak Umbi Mentimun Papasan

Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak etanolik umbi mentimun papasan dapat dilihat pada tabel 4.

5. Hasil Fraksinasi Umbi Mentimun Papasan

Hasil fraksinasi umbi mentimun papasan dapat dilihat pada tabel 5.

6. Hasil Identifikasi Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak dan Fraksi-Fraksi Umbi Mentimun Papasan

Setelah dilakukan skrining fitokimia kemudian dilakukan uji KLT untuk mempertegas hasil yang diperoleh dari skrining fitokimia. Identifikasi kromatografi lapis tipis ekstrak dan fraksi-fraksi umbi mentimun papasan dapat dilihat pada tabel 6 dan 7.

7. Hasil Uji Aktivitas Sitotoksik Hela Dengan Metode MTT

Hasil Hasil penetapan IC₅₀ ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air terhadap sel kanker Hela dan sel Vero serta penentuan indeks selektivitas dapat dilihat pada Tabel 8.

8. Hasil Uji Aktivitas Antiangiogenesis

Hasil pembuluh darah asal atau pembuluh darah utama yang secara makroskopis terlihat secara halus. Gambar 1 merupakan gambar angiogenesis pada CAM baik pada kelompok kontrol maupun pada kelompok uji. Hasil pengamatan rata-rata pertumbuhan angiogenesis, % pertumbuhan angiogenesis, dan % penghambatan angiogenesis pada kelompok kontrol dan kelompok uji dapat dilihat pada tabel 9.

Tabel 1. Hasil perhitungan rendemen serbuk umbi mentimun papasan

Berat Basah (g)	Berat Kering (g)	Rendemen (%)
2.100	1.000	47,6

Tabel 2. Rendemen Ekstrak Etanolik Umbi Mentimun Papasan

Pelarut	Serbuk + Pelarut Yang Digunakan	Warna Ekstrak	Berat Ekstrak Pekat (g)	Rendemen (%)
Etanol 96 %	500 gr + 2.500 ml	Coklat Pekat	97,65	19,53
	500 gr + 2.500 ml		99,27	19,85
Total	1.000 + 5.000 ml		196,92	39,38

Tabel 3. Hasil penetapan kadar air ekstrak umbi mentimun papasan

No	Bobot Ekstrak (g)	Skala (ml)	Kadar Air (%)
1	20	1,8	9
2	20	1,7	8,5
3	20	1,6	8
	Rata-rata	1,7	8,5

Tabel 4. Hasil skrining fitokimia

Senyawa	Pereaksi	Hasil pengamatan	Kesimpulan
Flavonoid	Serbuk Mg dan HCl Pekat	Merah kekuningan	+
Akaloid	Wagner, mayer, dragendof	Endapan cokelat kehitaman	+
Tanin	FeCl ₃	Endapan hijau	+
Fenol	FeCl ₃	Jingga endapan hijau	+
Saponin	Air panas	Cokelat berbusa	+
Terpen/ steroid			-

Tabel 5. Hasil penetapan % rendemen pembuatan fraksinasi

Berat ekstrak (g)	Berat fraksi n-heksan (g)	Berat fraksi etil asetat (g)	Berat fraksi air (g)
40	10,35	6,21	12,37
% rendemen	25,87	15,52	30,92

Tabel 6. Hasil kromatografi lapis tipis ekstrak umbi mentimun papasan

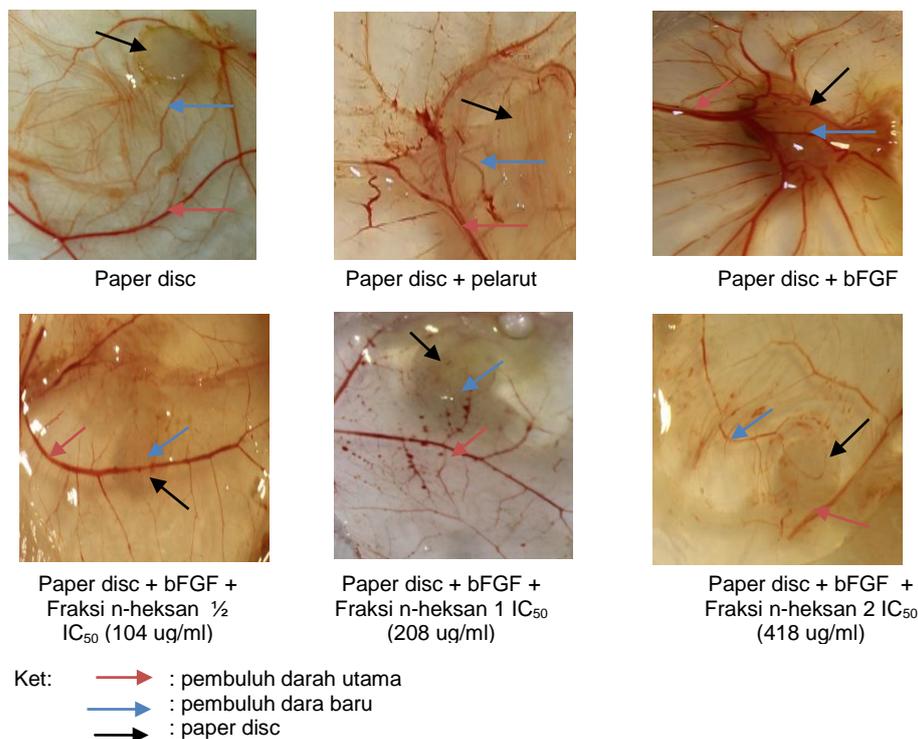
Pengujian	Fase diam	Fase gerak	Pereaksi semprot	Deteksi	Setelah Disemprot	
					Warna bercak	Hasil
Flavonoid	Silika gel 60 F254	Heksan:etil asetat :asam formiat (6:4:0,2)	Sitroborat		Kuning	+
Alkaloid		Toluen:etil asetat:dietil amin (7:2:1)	Dragendorf	UV 254 nm dan 366 nm	Orange	+
Tannin		Etil asetat:asam formiat:toluene :air (6:1,5:3:0,5)	FeCl ₃		Hijau tua kehitaman	+
Saponin		Kloroform: metanol :air (64:50:1)	Lieberman Bourchat		Coklat kehitaman	+
Terpen		Heksan :etil asetat (93:7)	Anisaldehyd asam sulfat		Merah keunguan	+

Tabel 7. Hasil kromatografi lapis tipis fraksi umbi mentimun papasan

Pengujian	Fase diam	Fase gerak	Pereaksi semprot	Deteksi	Setelah Disemprot	
					Warna bercak	Hasil
Fraksi n-heksan						
Flavonoid	Silika gel 60 F254	heksan:etil asetat:asam formiat (6:4:0,2)	Sitroborat	UV 254 nm dan 366 nm	Kuning	+
Alkaloid		Toluen: etil asetat:dietil amin (7:2:1)	Dragendorf		Orange	+
Tannin		Etil asetat:asam formiat:toluene :air (6:1,5:3:0,5)	FeCl ₃		Hijau tua kehitaman	+
Saponin		Kloroform: metanol :air (64:50:1)	Lieberman Bourchat		Coklat kehitaman	+
Terpen		Heksan :etil asetat (93:7)	Anisaldehyd asam sulfat		Merah keunguan	+
Fraksi Etil asetat						
Flavonoid	Silika gel 60 F254	heksan:etil asetat:asam formiat (6:4:0,2)	Sitroborat	UV 254 nm dan 366 nm	Kuning	+
Alkaloid		Toluen: etil asetat:dietil amin (7:2:1)	Dragendorf		Orange	+
Tannin		Etil asetat:asam formiat:toluene :air (6:1,5:3:0,5)	FeCl ₃		Hijau tua kehitaman	+
Saponin		Kloroform: metanol :air (64:50:1)	Lieberman Bourchat		Coklat kehitaman	+
Terpen		Heksan :etil asetat (93:7)	Anisaldehyd asam sulfat		Merah keunguan	+
Fraksi Air						
Flavonoid	Silika gel 60 F254	heksan:etil asetat:asam formiat (6:4:0,2)	Sitroborat	UV 254 nm dan 366 nm	Kuning	+
Alkaloid		Toluen: etil asetat:dietil amin (7:2:1)	Dragendorf		Orange	+
Tannin		Etil asetat:asam formiat:toluene :air (6:1,5:3:0,5)	FeCl ₃		Hijau tua kehitaman	+
Saponin		Kloroform: metanol :air (64:50:1)	Lieberman Bourchat		Coklat kehitaman	+
Terpen		Heksan :etil asetat (93:7)	Anisaldehyd asam sulfat		Merah keunguan	+

Tabel 8. Hasil penetapan IC₅₀ ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air terhadap sel kanker Hela dan sel Vero serta penentuan indeks selektivitas

Sampel	Nilai IC ₅₀ (µg/ml)		Indeks Selektivitas	Interpretasi
	Hela	Vero		
Ekstrak Etanol	986,604	377,631	0,382	Kurang selektif
Fraksi n-Heksan	208,776	426,940	2,044	Kurang selektif
Fraksi Etil Asetat	187,824	208,057	1,107	Kurang selektif
Fraksi Air	553,392	542,847	0,980	Kurang selektif
Doxorubicin	44,808	23,330	0,520	Kurang selektif



Gambar 1. Angiogenesis pada CAM pada kelompok kontrol dan kelompok uji fraksi n-heksan umbi mentimun papasan

Tabel 9. Hasil pengamatan rata-rata pertumbuhan angiogenesis, % pertumbuhan angiogenesis, dan % penghambatan angiogenesis pada kelompok kontrol dan kelompok uji.

Kelompok Perlakuan	Jumlah Telur	Jumlah Pembuluh Darah Baru X ± SD	Persen Pertumbuhan Pembuluh Darah Baru (%)	Persen Penghambatan Angiogenesis (%)
Paper disc + Bfgf	3	24,66 ± 2,30	100	0
Kontrol paper disc + pelarut	3	10,66 ± 2,51	100	0
Paper disc	3	13 ± 2	100	0
bFGF + Fraksi n-heksan ½ IC ₅₀ (104 µg/ml)	3	20,33 ± 1,55	82,44	17,56
bFGF + Fraksi n-heksan 1 IC ₅₀ (208 µg/ml)	3	14 ± 2	56,77	43,23
bFGF + Fraksi n-heksan 2 IC ₅₀ (418 µg/ml)	3	10,66 ± 1,15	43,22	56,78

PEMBAHASAN

Umbi mentimun papasan dilakukan penyerbukan menggunakan blender. Perlakuan ini bertujuan untuk meningkatkan luas permukaan sehingga mudah pada saat ekstraksi. Hasil persen berat kering terhadap berat basah umbi mentimun papasan menunjukkan bahwa umbi mentimun papasan dengan berat basah 2.100 gram dikeringkan dan diperoleh berat kering sebesar 1.000 gram (Tabel 1). Pada tahap ini dilakukan ekstraksi, menggunakan metode maserasi, yang mempunyai beberapa kelebihan antara lain alat yang digunakan sangat sederhana, mudah dan tidak melibatkan suhu tinggi sehingga zat-zat yang tidak tahan panas sehingga tidak mudah rusak. Pada proses maserasi dilakukan dalam keadaan wadah tertutup agar etanol tidak menguap dan dibiarkan pada suhu kamar selama 5 hari sesekali diaduk⁷. Dari hasil rendemen ekstrak mentimun papasan memiliki hasil yang baik dilihat pada tabel 2.

Penentuan kadar air ekstrak umbi mentimun papasan menggunakan metode gravimetric. Hasil penelitian kadar air bisa dilihat pada tabel 3. Berdasarkan hasil yang terlihat pada tabel 3, kadar air ekstrak mentimun papasan yang diperoleh 8,5% atau kurang 10% sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak mentimun papasan yang digunakan memenuhi persyaratan standar. Kadar air dalam ekstrak kurang dari 10% dapat meminimalisir tumbuhnya jamur dan kapang serta menghasilkan daya tahan penyimpanan dan mutu ekstrak mentimun papasan tetap baik⁸.

Setelah diperoleh ekstrak pekat kemudian dilakukan proses selanjutnya yaitu fraksinasi. Proses fraksinasi ini dilakukan dengan menggunakan corong pisah. Pada proses fraksinasi ini pelarut memiliki massa jenis, dimana massa jenis yang lebih tinggi

akan berada dilapisan bawah, dan yang memiliki massa jenis lebih kecil akan berada di lapisan atas. Sehingga senyawa yang terkandung didalam ekstrak akan terpisah sesuai dengan tingkat kepolaran pelarut yang digunakan. Pada perlakuan fraksinasi pertama adalah antara air ekstrak etanol dengan n-heksan dengan perbandingan 1:1 dan terbentuk dua lapisan yaitu lapisan atas fraksi n-heksan dan lapisan bawah fraksi air, dimana terdapat perbedaan massa jenis pelarut yang menyebabkan fraksi n-heksan berada diatas karena massa jenis n-heksan lebih kecil dari pada massa jenis air. Selanjutnya dilanjutkan dengan fraksinasi kedua antara fraksi air dengan etil asetat dengan perbandingan yang sama yaitu 1:1 setelah itu didapatkan tiap fraksi yang diuapkan.

Setelah dilakukan skrining fitokimia kemudian dilakukan uji KLT untuk mempertegas hasil yang diperoleh dari skrining fitokimia. Hasil kromatografi lapis tipis ekstrak dapat dilihat pada tabel 6. Dari hasil penelitian yang dilakukan secara skrining dan uji KLT pada ekstrak, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari umbi mentimun papasan diperoleh hasil positif mengandung senyawa golongan flavonoid, alkaloid, saponin, tannin dan terpen.

Berdasarkan nilai absorbansi yang telah diperoleh dilakukan penentuan persen viabilitas terhadap sel Hela. Selanjutnya dapat ditentukan nilai IC_{50} yang telah diperoleh. Dimana menunjukkan bahwa sampel dari fraksi etil asetat memiliki nilai IC_{50} terendah. IC_{50} dari fraksi etil asetat adalah 187,824 $\mu\text{g/mL}$. Menurut USA *National Cancer Institut* rentang nilai $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/ml}$ sangat toksik, 21-200 $\mu\text{g/ml}$ moderat/ cukup aktif, 201-500 $\mu\text{g/ml}$ lemah/ sedang, dan $\geq 500 \mu\text{g/ml}$ tidak toksik. Berdasarkan hasil tabel 6, dapat diketahui bahwa etil asetat memiliki aktivitas sitotoksik yang cukup aktif terhadap sel kanker Hela, sedangkan untuk fraksi n-heksan dapat

dikategorikan memiliki aktivitas yang lemah atau sedang dengan nilai IC_{50} 208 $\mu\text{g/mL}$. Sedangkan untuk perlakuan uji sitotoksik terhadap sel Vero menunjukkan bahwa fraksi air termasuk dalam katagori tidak toksik, sedangkan untuk ekstrak, fraksi *n*-heksan dan fraksi etil asetat dapat dikatakan memiliki aktivitas sitotoksik lemah dan untuk kontrol positif *doxorubicin* termasuk dalam katagori moderat atau cukup aktif dalam sel Vero. Hal ini disebabkan karena umbi mentimun papasan yang digunakan dalam penelitian ini belum dalam bentuk senyawa murni. Hasil yang diperoleh dari penelitian ini menyatakan bahwa ekstrak dan fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air umbi mentimun papasan memiliki aktivitas antikanker dengan kategori sedang.

Kriteria dalam pemilihan senyawa antikanker tidak hanya melihat dari sitotoksik saja, namun dilihat juga dari selektivitas pada sel normal. Tujuan dilakukan analisis selektivitas indeks adalah untuk mengetahui aman atau tidaknya suatu ekstrak yang memiliki aktivitas antikanker terhadap sel normal. Berdasarkan penelitian ekstrak, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari umbi mentimun papasan dikategorikan tidak selektif. Berdasarkan penelitian ekstrak, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari umbi mentimun papasan dikategorikan tidak selektif.

Analisis kualitatif secara kromatografi lapis tipis dilakukan terhadap beberapa senyawa umbi mentimun papasan terdapat senyawa yang diduga memiliki aktivitas antikanker, yaitu alkaloid, flavonoid, saponin, tannin dan terpen, yang diduga memiliki aktivitas yang terkait dengan potensi antikanker.

Berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh⁶ dapat bersifat sitotoksik

terhadap sel BSLT dengan LC_{50} dalam kisaran 23-32 $\mu\text{g/mL}$. Hasil penelitian lain dari tanaman yang mempunyai Family cucurbitacea yang memiliki aktivitas antikanker ialah pare. Hasil penelitian menunjukkan fraksi etil asetat dapat membunuh sel kanker Hela dengan nilai IC_{50} 34,9221 $\mu\text{g/mL}$ ⁹. Dari hasil uji aktivitas antikanker yang mempunyai nilai IC_{50} yang paling kecil yaitu fraksi etil asetat dan *n*-heksan dengan nilai IC_{50} 187,824 $\mu\text{g/mL}$ dan 208,776 $\mu\text{g/mL}$. Selanjutnya fraksi *n*-heksan umbi mentimun papasan dilakukan pengujian lanjutan terhadap angiogenesis dengan menggunakan metode CAM. Dipilih fraksi *n*-heksan karena memiliki nilai IC_{50} terendah kedua dari fraksi etil asetat dan memiliki indeks selektivitas yang hampir mendekati angka tiga.

Berdasarkan hasil pengamatan mikroskopik terhadap CAM kelompok kontrol *paper disc* (tabel 9) menunjukkan bahwa jumlah pembuluh darah di dalam *paper disc* maupun pada daerah di sekeliling merupakan pertumbuhan pembuluh darah secara normal dengan rata-rata jumlah pembuluh darah baru 13 ± 2 . Berdasarkan hasil pengamatan tersebut, *paper disc* dapat digunakan sebagai pembawa dalam metode angiogenesis. Karena pengamatan *paper disc* tidak mempengaruhi angiogenesis pada CAM. Kelompok kontrol berikutnya adalah kelompok kontrol pelarut (tabel 8), dengan menunjukkan hasil rata-rata jumlah pembuluh darah baru sebesar $10,66 \pm 2,51$.

Berdasarkan hasil pengamatan tersebut, dengan menggunakan pelarut DMSO 0,8% untuk mengetahui apakah pelarut DMSO berpengaruh terhadap pengamatan pada CAM atau tidak dapat dilihat pada tabel 7 bahwa kelompok pelarut dengan kelompok *paper disc* hal ini menunjukkan bahwa

pelarut yang digunakan tidak memberikan efek angiogenesis pada CAM yang berarti pelarut dapat digunakan sebagai pelarut fraksi. Selanjutnya untuk pengamatan pada kelompok bFGF dimana terlihat pada tabel 7, menunjukkan rata-rata jumlah pembuluh darah baru adalah $24,66 \pm 2,30$. Berdasarkan hal ini berarti pemberian bFGF dapat memicu pembentukan pertumbuhan pembuluh darah baru atau memicu terjadinya angiogenesis pada CAM.

Selanjutnya pada kelompok konsentrasi fraksi *n*-heksan umbi mentimun papasan $\frac{1}{2}$ IC₅₀ yaitu 104 µg/ml dengan hasil rata-rata jumlah pembuluh darah baru yaitu $20,33 \pm 1,52$ (8), dan untuk konsentrasi 1 IC₅₀ yaitu 208 µg/ml dengan jumlah pembuluh darah baru \pm SD 14 ± 2 sedangkan untuk konsentrasi fraksi *n*-heksan umbi mentimun papasan 2 IC₅₀ 418 µg/ml dengan hasil jumlah pembuluh darah baru yaitu \pm SD $10,66 \pm 1,15$ (tabel 8),

Dari hasil pengamatan dapat dilihat bahwa persen penghambatan angiogenesis menunjukkan bahwa konsentrasi dari $\frac{1}{2}$ IC₅₀ yaitu 104 µg/ml, menunjukkan hambatan angiogenesis yang kecil dibandingkan dengan konsentrasi 1 IC₅₀ 208 µg/ml dan 2 IC₅₀ 418 µg/ml memiliki persen penghambatan yang besar, dimana menunjukkan bahwa berarti semakin besar konsentrasi yang digunakan akan semakin besar penghambatan angiogenesis.

Angiogenesis dapat membuat sel kanker menjadi lebih besar dengan cara membentuk pembuluh darah baru yang menyebabkan sel kanker mendapatkan suplai nutrisi dan makanan sehingga sel kanker akan terus berkembang⁹. Mekanisme angiogenesis ini diatur oleh faktor pro angiogenik dan anti angiogenik. *Basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) merupakan salah satu faktor pro

angiogenik. bFGF berinteraksi dengan sel endothelial melalui reseptor tirosin kinase dan reseptor *heparin sulfate proteoglycan* dipermukaan sel. Kejadian tersebut dapat menyebabkan terjadinya pelepasan matriks pendegradasi membrane basal. Peran bFGF pada keadaan patologi kanker adalah untuk perkembangan sel kanker itu sendiri dan juga sebagai penginduksi pembuluh darah baru untuk mensuplai makanan dan nutrisi. Selain bFGF, terdapat faktor pro angiogenik lainnya seperti *endotel vascular-derived growth factor* (VEGF), *angiopoetins*, *epidermal growth factor* (EGF), *interleukin 8* (IL-8), dan *transforming growth factor* (TGF-). Semua faktor-faktor pro angiogenik ini akan menjadi berbahaya pada kondisi patologi kanker. Apabila terjadi penghambatan pembentukan pembuluh darah baru, maka peryumbuhan sel tumor maupun kanker akan terhambat karena tidak mendapatkan suplai nutrisi¹⁰.

Pemberian bFGF sebagai induktor dapat memberikan sedikit gambaran mengenai kemungkinan mekanisme aksi penghambatannya. Berbagai senyawa yang mungkin terkandung didalam fraksi *n*-heksan umbi mentimun papasan diantaranya tannin, saponin, alkaloid dan flavonoid diduga berperan dalam kemampuan menghambat angiogenesis. Tannin berperan sebagai antiproliferatif sel kanker yang bekerja pada tingkat sel dengan memblokir fase S dari siklus sel. Senyawa saponin juga dapat menginduksi apoptosis dan dapat menghambat proses angiogenesis¹¹. Adapun senyawa alkaloid juga memiliki aktivitas antiangiogenesis *pterogynidine* yang diisolasi dari *Alchornea glandulosa* *Pterogynidine* bekerja dengan menghambat aktivitas endothelial. Sehingga terdapat kemungkinan senyawa alkaloid yang

terdapat dalam fraksi *n*-heksan umbi mentimun papasan juga berperan terhadap aktivitas antiangiogenesis.

Beberapa penelitian mengenai flavonoid merekomendasikan kemungkinan aksinya sebagai senyawa aktif sehingga mampu menghambat kanker dan diantaranya melalui penghambatan angiogenesis. Flavonoid tersebut, diantaranya *resveratrol* dan *quersetin* pada kadar 100 μ M mampu menghambat aspek-aspek angiogenesis (proliferasi, migrasi sel endothelial dan pembentukan pipa pembuluh darah)¹² selain itu, *resveratrol* menghambat angiogenesis yang diinduksi oleh bFGF pada CAM dan juga menghambat pertumbuhan tumor pada CAM. Angiogenesis dapat diblok oleh inhibitor COX-2 yang diinduksi bFGF. COX-2 berperan dalam proses angiogenesis melalui sintesis prostaglandin. Prostaglandin berperan penting di dalam induksi bFGF. Oleh karena itu penghambatan aktivitas COX-2 akan berakibat pada penghambatan angiogenesis. Kandungan dalam fraksi *n*-heksan umbi mentimun papasan mungkin bertindak sebagai penghambat COX-2 yang dapat memblok prostaglandin. Senyawa flavonoid yang kemungkinan terkandung dalam fraksi *n*-heksan umbi mentimun papasan kemungkinan mampu menghambat bFGF, sehingga stimulasi bFGF tidak sampai ke reseptor di permukaan sel. Akibatnya bFGF tidak dapat ditangkap oleh reseptor sehingga terjadi ikatan antara bFGF dengan reseptor dan aktivitas proliferasi pun tidak terjadi. Pada penelitian ini, terbukti bahwa fraksi *n*-heksan umbi mentimun papasan mampu menghambat pembentukan pembuluh darah baru. Penghambatan tersebut diduga disebabkan karena adanya senyawa-senyawa yang terkandung dalam fraksi *n*-heksan umbi mentimun papasan,

yang memiliki aktivitas sebagai angiogenesis.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa fraksi *n*-heksan dan fraksi etil asetat memiliki aktivitas sitotoksik yang sedang terhadap sel Hela, sedangkan ekstrak dan fraksi air memiliki efek sitotoksik yang tidak toksik terhadap sel Hela dan memiliki nilai IC₅₀ yaitu 986,604; 187,776; 208,776; dan 553,392 μ g/ml. Fraksi *n*-heksan umbi mentimun papasan memiliki aktivitas antiangiogenesis pada CAM embrio ayam yang diinduksi protein bFGF. Fraksi *n*-heksan memiliki aktivitas antiangiogenesis pada konsentrasi 2 IC₅₀ yaitu 418 μ g/mL.

DAFTAR PUSTAKA

1. Wijayanti E. Gambaran Perilaku Berisiko Penyakit Kanker di Desa Pangkalan dan Desa Rancailat, Provinsi Banten. *Yars Med J.* 2018;26(1):012.
2. Emilio Kalonio D, Hendriani R, Elisabeth Barung dan N, Farmasi J, Kesehatan Kemenkes Manado P, Raya Bandung J, et al. Aktivitas Antikanker Tanaman Genus *Clerodendrum* (Lamiaceae): Sebuah Kajian Anticancer Activity Of Plant Genus *Clerodendrum* (Lamiaceae): A Review. *Tradit Med J.* 2017;22(3):2017.
3. Colditz GA. American Cancer Society. SAGE Encycl Cancer Soc. 2015;
4. Iwan Sahrial Hamid, Dady Soegianto Nazar HR. Hambatan Ekspresi Vascular Endothelial Growth Factor oleh Ekstrak Daun Sambung Nyawa pada Endotel Membran Korioalantois. *Univ Airlangga.* 2013;14(1):85–90.
5. Voigt L, Rukmana RM, Nugroho RB, Wisnumurti DA, Wibawa A. DOI: 10.30644/rik.v8i2.233. 2019;8(2):91–8.
6. *Farmasains-Uhamka-Vol-1-no-1-Churiyah.* www.farmasains.uhamka.ac_id_.pdf.

7. Artikel I, Vero S, Line VC. Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Dan Fraksi Hasil Fermentasi Fungi Endofit Genus *Cephalosporium* Sp . Diisolasi Dari Daun Meniran (*Phyllanthus Niruri* Linn .) Cytotoxic Activity Of Fermentation Extract And Fraction Endophytic Fungi Genus *Cephalosporium* Sp Isola. 2016;5–10.
8. Sulistyani N. Penetapan Parameter Standardisasi Non Spesifik Dan Spesifik Ekstrak Daun Pacar Kuku (*Lawsonia inermis* L.). *Media Farm J Ilmu Farm.* 2016;13(2):212–26.
9. Zahrah, A., Sunaryo, H. & K. Uji sitotoksitas buah pare. *Fak Farm dan sains Univ muhammadiyah prof Dr Hamka.* 2010;1–7.
10. Pratomo NA, Yunita E, Widyarini S, Anshory H. Efek Anti Angiogenesis Temu Kunci (*Boesenbergia Pandurata*, (Roxb.) Schlecht) Pada Membran Korio Alantois Embrio Ayam Yang Diinduksi Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF). *Khazanah.* 2014;6(2):35–45.
11. Tong QY, Qing Y, Shu D, He Y, Zhao YL, Li Y, et al. Deltonin, a steroidal saponin, inhibits colon cancer cell growth in vitro and tumor growth in vivo via induction of apoptosis and antiangiogenesis. *Cell Physiol Biochem.* 2011;27(3–4):233–42.
12. Mustafida RY, Munawir A, Dewi R. Efek Antiangiogenik Ekstrak Etanol Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) pada Membran Korio Alantois (CAM) Embrio Ayam. *e-Jurnal Pustaka Kesehat.* 2014;2(1):5–9.