 DOI : 10.35311/jmpi.v11i2.837

## Uji Sitotoksik Ekstrak dan Fraksi Daun Dollu (*Dodonaea viscosa* Jacq.) terhadap Sel Kanker Payudara T47D serta Ekspresi Protein p53 dan Bcl-2

Rizka Agustine Susilowati\*, Titik Sunarni, Ana Indrayati

Program S2 Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi Surakarta

**Sitasi:** Susilowati, R. A., Sunarni, T., & Indrayati, A. (2025). Uji Sitotoksik Ekstrak dan Fraksi Daun Dollu (*Dodonaea viscosa* Jacq.) terhadap Sel Kanker Payudara T47D serta Ekspresi Protein p53 dan Bcl-2. *Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia*, 11(2), 634–647.  
<https://doi.org/10.35311/jmpi.v11i2.837>

Submitted: 04 Juni 2025

Accepted: 16 Desember 2025

Published: 31 Desember 2025

\*Penulis Korespondensi:  
Rizka Agustine Susilowati  
Email:  
[rizkaagustine2008@gmail.com](mailto:rizkaagustine2008@gmail.com)



Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

### ABSTRAK

Kanker payudara merupakan penyebab utama kematian akibat kanker di dunia, dengan lebih dari 396.000 kasus per tahun. Tanaman Dollu (*Dodonaea viscosa* Jacq) diketahui memiliki sifat antibakteri, namun potensinya sebagai agen antikanker belum banyak diteliti. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas sitotoksik ekstrak dan fraksi daun Dollu terhadap sel kanker T47D, menilai selektivitasnya, dan menyelidiki efeknya terhadap ekspresi protein p53 dan Bcl-2 pada sel kanker tersebut. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% selama tiga hari. Ekstrak dan fraksi yang dihasilkan (etanol, air, etil asetat, dan n-heksan) dianalisis untuk senyawa kimia, termasuk flavonoid, tanin, alkaloid, saponin, steroid, dan terpenoid. Uji sitotoksik dilakukan menggunakan metode MTT, diikuti dengan uji selektivitas, dan ekspresi protein p53 serta Bcl-2 dianalisis menggunakan imunositokimia. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi air menunjukkan aktivitas sitotoksik paling efektif dengan nilai IC<sub>50</sub> 139,84 ± 13 µg/mL. Ekstrak dan fraksi menunjukkan nilai selektivitas >2. Selain itu, fraksi air secara signifikan meningkatkan ekspresi protein p53 dengan nilai EC<sub>50</sub> 44,41 ± 7,09 µg/mL, yang menunjukkan hasil signifikan pada uji ANOVA (nilai p 0,000 < 0,05). Sebaliknya, fraksi air secara signifikan menurunkan ekspresi Bcl-2 dengan nilai EC<sub>50</sub> 193,22 ± 20,99 µg/mL, yang menunjukkan hasil signifikan pada uji Kruskal-Wallis (nilai p 0,022 < 0,05).

**Kata kunci:** Daun Dollu (*Dodonaea viscosa* Jacq.), Sel Kanker T47D, p53, Bcl-2

### ABSTRACT

Breast cancer is the leading cause of cancer-related deaths worldwide, with over 396,000 cases annually. The Dollu plant (*Dodonaea viscosa* Jacq) is known for its antibacterial properties, but its potential as an anticancer agent has not been widely studied. This study aims to evaluate the cytotoxic activity of the extract and fractions of Dollu leaves against T47D cancer cells, assess their selectivity, and investigate their effects on the expression of p53 and Bcl-2 proteins in these cancer cells. Extraction was performed using the maceration method with 96% ethanol solvent for three days. The resulting extract and fractions (ethanol, water, ethyl acetate, and n-hexane) were analyzed for chemical compounds, including flavonoids, tannins, alkaloids, saponins, steroids, and terpenoids. Cytotoxicity was tested using the MTT method, followed by selectivity tests, and the expression of p53 and Bcl-2 proteins was analyzed using immunocytochemistry. The results showed that the water fraction exhibited the most effective cytotoxic activity with an IC<sub>50</sub> value of 139.84 ± 13 µg/mL. The extract and fractions showed selectivity values greater than 2. Furthermore, the water fraction significantly increased p53 protein expression with an EC<sub>50</sub> value of 44.41 ± 7.09 µg/mL, showing a significant result in the ANOVA test (p-value 0.000 < 0.05). In contrast, the water fraction significantly decreased Bcl-2 expression with an EC<sub>50</sub> value of 193.22 ± 20.99 µg/mL, showing a significant result in the Kruskal-Wallis test (p-value 0.022 < 0.05).

**Keywords:** Dollu Leaves (*Dodonaea viscosa* Jacq.), T47D cancer cell, p53, Bcl-2

### PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan salah satu penyebab kematian tertinggi akibat kanker secara global. Menurut data *Global Burden of Cancer* (GLOBOCAN) tahun 2020, di Indonesia tercatat 68.858

kasus baru kanker payudara dari total 396.914 kasus kanker baru yang terjadi pada tahun tersebut. Dalam konteks penelitian, beberapa lini sel kanker payudara yang umum dipakai meliputi T47D, MCF-7, dan EVSA-T. Lini sel T47D, secara khusus, sering

dimanfaatkan dalam studi ilmiah untuk mengeksplorasi mekanisme patogenesis kanker, respons seluler terhadap hormon seperti estrogen, serta untuk menilai efektivitas berbagai agen kemoterapi.

Sistem sel kanker bisa dilaksanakan perbaikan dari segi fisiologis dengan menghambat proses apoptosis, sebagaimana dijelaskan oleh Hanahan & Weinberg (2000). Apoptosis berperan krusial dalam mempertahankan homeostasis dan regulasi perkembangan sel pada organisme multiseluler. Salah satu mekanisme utama yang terlibat dalam proses ini adalah aktivasi enzim caspase melalui jalur mitokondria. Mekanisme aktivasi tersebut dikendalikan oleh keluarga protein Bcl-2, yang berperan dalam mengatur permeabilitas membran mitokondria sehingga memungkinkan pelepasan sitokrom (Antonsson, 2001, Burlacu, 2003). Di sisi lain, protein p53 merupakan salah satu protein penekan tumor yang berperan sentral dalam regulasi proses apoptosis. Protein ini bertindak sebagai aktivator transkripsi yang mengendalikan ekspresi berbagai protein pro-apoptotik (Chong *et al.*, 2000; Haupt *et al.*, 2003).

Upaya pencarian senyawa antikanker berbasis sumber daya alam terus mengalami perkembangan, seiring dengan meningkatnya insidensi kanker dan keterbatasan efektivitas serta ketersediaan obat antikanker konvensional yang ada saat ini (Gibbs JB, 2000). Sejumlah langkah diperlukan untuk mengembangkan pengobatan antikanker yang efektif, seperti menentukan zat kimia mana yang aktif dan bagaimana cara kerjanya. Zat kimia alkilasi yang mengikat DNA dan antimetabolit yang menghambat proses metabolisme vital seperti produksi asam folat adalah dua contoh dari sekian banyak cara kerja obat antikanker. Kelas zat kimia lain yang disebut agen khusus siklus sel (CCS) mencakup obat antiproliferatif seperti vinkristin dan vinblastin, yang menghentikan sel untuk berkembang biak (Mulyadi, 1998).

Komposisi komponen kimia dari beberapa spesies tanaman telah diteliti dalam upaya untuk menciptakan obat tradisional. Salah satu spesies tersebut adalah tanaman *Dodonaea viscosa* Jacq., yang secara lokal dikenal sebagai dollu. Habitat asli tanaman ini berada di Provinsi Papua Barat, yaitu daerah Wamena. Masyarakat adat Wamena menghormati anggota keluarga inti yang telah meninggal dengan ritual yang mencakup pemotongan jari mereka sebagai perban alami memakai daun dollu (Chrystomo *et al.*, 2016).

*Dodonaea viscosa* Jacq. memiliki potensi

farmakologis yang menjanjikan dalam mengatasi beragam jenis penyakit, sehingga tanaman ini layak untuk dilaksanakan pembudidayaan dengan cara komersial. Di Selandia Baru, tumbuhan tersebut dimanfaatkan sebagai agen penyembuh luka, sedangkan di wilayah Afrika, penggunaannya mencakup pengobatan gangguan pencernaan, penyakit kulit, pembengkakan, rematik, kelainan tulang, nyeri otot, serta pruritus. Selain itu, kombinasi daun dan akarnya secara tradisional dipakai untuk meredakan gejala maag dan sakit kepala (AL-Oraini & Hossain, 2016).

*Dodonaea viscosa* Jacq. mengandung berbagai senyawa kimia, termasuk senyawa siklik nitrogen, flavonoid, minyak atsiri, saponin, fenol siklik dan asiklik, tanin, karbohidrat, serta gula (Venkatesh *et al.*, 2008). Hasil penelitian terdahulu memperlihatkan yaitu berbagai senyawa yang berhasil diisolasi dari seluruh bagian tanaman *Dodonaea viscosa* memiliki beragam berat molekul. Senyawa-senyawa tersebut mencakup kalkon, saponin triterpenoid, turunan flavonol teralkilasi C, flavonol terisoprenilasi A-J, asam hautriwaic, isorhamnetin, kaempferol, quercetin, metil dodovisat B, asam hardwickiic, viscosol, asam dodonat, serta komponen volatil seperti minyak atsiri, disertai kandungan mineral dan elemen jejak lainnya (Venkatesh *et al.*, 2008).

Saponin triterpenoid *Dodonaea viscosa* memperlihatkan aksi antiproliferatif terhadap sel kanker ovarium manusia A2780 dalam sebuah studi tahun 2009 oleh Cao *et al.* Selain itu, quercetin, sebuah molekul flavonol, memperlihatkan kemanjuran kemopreventif yang kuat dengan menghentikan perkembangan sel kanker. (Rather R.A., 2019). Sitotoksitas suatu zat kimia dapat dinilai dengan sejumlah teknik yang berbeda, termasuk uji MTT, filtrasi molekuler, pelepasan isotop kromium, pelapisan agar, dan pewarnaan eksklusif dengan biru tripan. Uji MTT menonjol di antara pendekatan-pendekatan ini karena penggunaannya yang luas dalam mengevaluasi efek sitotoksik, viabilitas sel, dan toksisitas kultur sel. Ada banyak pengetahuan yaitu pendekatan ini cukup sensitif terhadap aktivitas proliferasi sel. Pembaca ELISA dipakai untuk mengevaluasi data yang didapat dari percobaan MTT untuk menghitung nilai IC50. Selain itu, untuk menentukan indeks selektivitas sampel uji, nilai IC50 sel vero normal dibandingkan dengan sel kanker T47D.

Penelitian ini bertujuan untuk menilai potensi ekstrak dan fraksi daun dollu sebagai obat antikanker berbasis protein. Aktivitas sitotoksik diuji memakai teknik uji MTT, seperti yang dijelaskan di

latar belakang. Untuk melaksanakan studi perbandingan, sel kanker T47D dipakai sebagai model untuk sel kanker dan sel vero sebagai sel normal. Pendekatan imunositokimia dipakai untuk menilai ekspresi protein p53 dan Bcl-2 setelah uji sitotoksitas memakai uji MTT. Sebagai penekan tumor yang penting, protein p53 mengendalikan perkembangan siklus sel dan memicu kematian sel sebagai reaksi terhadap kerusakan DNA. Ketika sel mengalami stres atau rusak, p53 terbentuk di nukleusnya dan memicu serangkaian peristiwa yang memperbaiki DNA atau menyebabkan kematian sel.

Protein Bcl-2, di sisi lain, terlibat dalam mencegah kematian sel terprogram dengan bertindak sebagai faktor antiapoptotik dan memblokir jalur apoptosis mitokondria. Sel kanker biasanya mengekspresikan protein Bcl-2 secara berlebihan, yang membantu sel tumor bertahan hidup. Dalam studi onkologi, analisis ekspresi protein p53 dan Bcl-2 memberikan informasi penting mengenai keseimbangan antara survival dan apoptosis seluler.

Mutasi pada gen p53 umumnya menyebabkan kegagalan induksi apoptosis, sementara peningkatan ekspresi Bcl-2 memperkuat resistensi sel kanker terhadap kematian sel. Oleh karena itu, evaluasi terhadap kedua protein ini memiliki nilai prognostik dan dapat dijadikan dasar dalam pengambilan keputusan terapeutik. Teknik imunositokimia memungkinkan visualisasi ekspresi protein p53 dan Bcl-2 di dalam sel, sehingga memberikan pemahaman lebih lanjut mengenai peran keduanya dalam proses perkembangan kanker.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan eksperimental terhadap potensi efek sitotoksik ekstrak dan fraksi daun dollu pada lini sel kanker payudara T47. Imunositokimia dipakai untuk menganalisis ekspresi protein p53 dan Bcl-2, yang merupakan indikasi aktivitas apoptosis, sedangkan uji MTT dipakai untuk menguji sitotoksitas.

### Alat

Alat yang digunakan antara lain oven, blender, neraca analitik, corong pisah, dan evaporator untuk proses ekstraksi dan pemurnian. Selain itu, tabung reaksi, labu Erlenmeyer, autoklaf, LAF, pembaca ELISA, mikropipet, inkubator suhu 37°C, pengaduk magnetik.

### Bahan

Bahan-bahan yang dipakai dalam penelitian ini meliputi galur sel T47D, natrium bikarbonat,

HEPES, FeCl<sub>3</sub> 1%, sel Vero, penisilin-streptomisin 1% v/v (Gibco), antibodi protein p53 dan antibodi protein Bcl-2, Kertas Saring, Natrium Dodecyl Sulfate 10% dalam HCl 0,1 N sebagai penyumbat media pencuci sel, Dragendorf, Kloroform, media RPMI 1640 (Gibco), larutan PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7,2, Bubuk Mg, daun dollu segar, Tripsin 0,5% MTT 5 mg/ml, amonium hidroksida, mesin vortex, Aquades, larutan PBS, media DMEM, NaOH, amil alkohol, DMSO, n-heksana, Nunclone, asetat anhidrat, etanol 96%, Mayer

### Pengambilan Sampel Daun Dollu

Di Kabupaten Wamena, Papua Tengah, sampel daun dollu segar dan hijau dikumpulkan. Daun tanaman dollu pertama-tama dibilas di bawah air mengalir untuk menghilangkan kotoran atau serpihan, lalu dibiarkan kering secara alami di bawah sinar matahari dan udara.

### Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Dollu

Dalam wadah ekstraksi, 1500 mL etanol 96% dipakai untuk melarutkan 1005 gram simplisia bubuk kering. Setelah itu, tutup wadah diletakkan di atas dan dibiarkan selama tiga hari. Filtrat awal dan ampas didapat dengan menyaring campuran memakai kertas saring setelah prosedur maserasi pertama. Filtrat kedua didapat dengan mengekstraksi ulang padatan residu dengan 1500 mL etanol 96% selama dua hari, dengan pengadukan setiap hari. Ekstrak kental dibuat dengan menggabungkan filtrat pertama dan kedua dan menguapkannya memakai evaporator, yang selanjutnya dipakai dalam proses fraksinasi. Untuk mengetahui % rendamen ekstrak digunakan rumus berikut:

$$\% \text{ Rendamen} = \frac{\text{Berat Ekstrak yang Didapat}}{\text{Berat Serbuk Simplisia yang Di Ekstraksi}} \times 100\%$$

### Pembuatan Fraksi Ekstrak Etanol Daun Dollu

Teknik ekstraksi cair-cair dipakai untuk melaksanakan prosedur fraksinasi. Sebanyak 50 gram ekstrak daun dollu diencerkan dengan campuran etanol dan air dengan perbandingan 4:1, dipindahkan ke corong pisah, dan terakhir diekstraksi dengan pelarut n-heksana. Campuran dikocok dengan hati-hati sambil sesekali membuka penutup corong untuk mengurangi tekanan, lalu dibiarkan hingga terbentuk dua fase: fase bawah berupa etanol-air dan fase atas berupa n-heksan. Selanjutnya, ditambah 100 mL air ke dalam corong pisah dan campuran dikocok kembali, kemudian dibiarkan hingga pemisahan dua fase semakin jelas.

Hingga didapat fraksi bening, fasa n-heksana pada lapisan atas dikeluarkan secara perlahan dan ditampung dalam wadah tersendiri. Fraksi etanol-air

dan fraksi etil asetat didapat dengan mengekstraksi kembali sisa fasa etanol-air dengan etil asetat. Proses tersebut dilaksanakan hingga proporsi etil asetat yang dihasilkan tampak bening. Menurut Ilhami dkk (2013), fraksi n-heksana, etil asetat, dan etanol-air diisolasi dengan cara menguapkannya dalam rotary evaporator yang diatur pada suhu 60°C. Fraksi-fraksi tersebut kemudian dikeringkan di atas penangas air yang dijaga pada suhu yang sama hingga didapat fraksi kental. Skrining Fitokimia Ekstrak dan Fraksi Daun Dollu Flavonoid melibatkan penghitungan rendemen setiap fraksi dan analisis komposisinya memakai Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

#### **Skrining Fitokimia Ekstrak dan Fraksi Daun Dollu**

##### **1. Flavonoid**

Sebelum menambahkan 10 mL air mendidih, 0,1 gram bubuk magnesium, dan 2 mL larutan asam sulfat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 5 mg ekstrak daun dollu ditimbang dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Lapisan amil alkohol memperoleh rona jingga-kuning, yang memperlihatkan respons yang baik (Harborne, 1987).

##### **2. Tanin**

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambah sedikit larutan HCl 2N, kemudian dipanaskan dan dilanjutkan dengan penambahan larutan Mayer. Adanya alkaloid ditunjukkan oleh terbentuknya endapan berwarna putih atau kuning. Pada uji Dragendorff, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna cokelat hingga hitam, sedangkan pada uji Wagner, keberadaan alkaloid diindikasikan oleh terbentuknya endapan putih atau garam berwarna cokelat kemerahan (Depkes RI, 1977).

##### **3. Saponin**

Dalam tabung reaksi, 5 miligram ekstrak daun dollu diukur dan dimasukkan bersama dengan 10 mililiter air panas. Cairan dikocok dengan keras selama kisaran 10 detik setelah didinginkan. Adanya busa stabil yang bertahan setidaknya selama 10 menit dan dapat menggapai ketinggian 1-10 cm merupakan indikasi adanya bahan kimia saponin. Bahkan setelah menambahkan larutan HCl 2N, buih tetap ada. (Depkes RI, 1977).

##### **4. Steroid dan Terpenoid**

Setelah mengeringkan 2 mililiter ekstrak kental dalam cawan penguap, residu yang tersisa dilarutkan memakai setengah mililiter kloroform. Kemudian, 2 mL asam sulfat pekat dituangkan perlahan melalui dinding tabung reaksi setelah 0,5 mL asam asetat anhidrat. Sebaliknya, senyawa terpenoid ditunjukkan dengan adanya cincin berwarna cokelat atau ungu di perbatasan antara kedua fase, sedangkan

senyawa steroid ditunjukkan dengan adanya cincin biru kehijauan (Ciulei, 1984).

#### **Identifikasi Golongan Senyawa Kimia Ekstrak dan Fraksi Daun Dollu Secara KLT**

Setelah dilaksanakan skrining fitokimia untuk mengidentifikasi golongan senyawa kimia pada ekstrak dan fraksi daun dollu yang memperlihatkan hasil positif, tahap selanjutnya adalah melaksanakan verifikasi dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Metode ini dipakai untuk menentukan nilai faktor retardasi (Rf) dengan membandingkan sampel terhadap standar pada masing-masing golongan senyawa.

##### **1. Identifikasi flavonoid**

Fase gerak yang terdiri dari kloroform: metanol (4:1) dan reaprotein untuk deteksi bercak memakai sitoborat dipakai dalam kromatografi lapis tipis untuk mengevaluasi fraksi. Hasilnya kemudian dibaca di bawah UV 254 nm dan 366 nm. Ketika dikombinasikan dengan pembanding quercetin, flavonoid menyebabkan kulit menguning sementara (Harborne, 1987).

##### **2. Identifikasi alkaloid**

Menitikan fraksi cair ke fase diam silika gel GF254 dan memakai fase gerak yang terdiri dari metanol:amonium hidroksida (100:3) memungkinkan kromatografi lapis tipis untuk mengevaluasi fraksi setelah dilarutkannya pada metanol. Pereaksi Dragendorff disemprotkan. Selanjutnya, dibaca pada 254 dan 366 nm memakai sinar ultraviolet. Warnanya menjadi jingga kecokelatan ketika diolah dengan pereaksi Dragendorff (Ahmad et al., 2017).

##### **3. Identifikasi tanin**

Setelah melarutkan fraksi dalam metanol, fraksi tersebut dikenai kromatografi lapis tipis. Teknik ini meliputi penitikan fraksi cair ke fase stasioner silika gel GF254, dengan fase gerak yang terdiri dari campuran etil asetat dan kloroform dengan perbandingan 7:3. Pengaplikasian lapisan tipis reagen FeCl<sub>3</sub> menyebabkan warna merah muda pada 366 nm dan efek peredaman pada UV 254 nm. Hasilnya menjadi hitam saat Anda memakai reagen semprot (Masriani et al., 2023).

#### **Uji Aktivitas Sitotoksik Fraksi Aktif Daun Dollu**

##### **1. Pembuatan medium kultur**

Siapkan 500 mL media dasar RPMI-1640 untuk kultur sel T47D. Kemudian, tambah 50 mL fetal bovine serum (FBS) yang merupakan 10% dari total volume, 5 mL L-glutamin dengan konsentrasi 2 mM, 5 mL campuran penisilin-streptomisin dengan konsentrasi masing-masing 100 U/mL dan 100 µg/mL, serta 2,2 g natrium bikarbonat (NaHCO<sub>3</sub>)

guna penstabilan pH medium. Selanjutnya, tambah air deionisasi sampai volume total menggapai 1 liter. Media tersebut kemudian disterilkan dengan penyaringan memakai membran filter berpori 0,22 mikron untuk mencegah kontaminasi. Media RPMI-1640 yang telah dipersiapkan dan disterilkan bisa ditaruh dalam suhu 4°C sampai dipakai. Sebelum penggunaan, pastikan media ada di suhu ruang kisaran 37°C dan lakukan pemeriksaan pH untuk menjamin ada pada rentang 7,2–7,4 (Freshney, 2010).

Siapkan 500 mL media dasar DMEM untuk kultur sel Vero. Tambah 50 mL fetal bovine serum (FBS), setara dengan 10% dari volume total, 5 mL L-glutamin pada konsentrasi 2 mM, 5 mL campuran penisilin-streptomisin dengan konsentrasi masing-masing 100 U/mL dan 100 µg/mL, serta 3,7 g natrium bikarbonat (NaHCO<sub>3</sub>) untuk menjaga kestabilan pH medium. Selanjutnya, tambah air deionisasi sampai volume total menggapai 1 liter. Media tersebut kemudian disterilkan melalui penyaringan memakai membran filter berpori 0,22 mikron guna mencegah kontaminasi. Media DMEM yang telah dipersiapkan dan disterilkan bisa ditaruh dalam suhu 4°C sampai dipakai. Sebelum penggunaan, pastikan media ada di suhu ruang kisaran 37°C dan lakukan pengukuran pH untuk menjamin nilai ada pada rentang 7,2–7,4 (Gibco, 2013)

## 2. Panen sel

Awalnya, sel-sel ditanam dan diinkubasikan dalam cawan petri. Setelah masa inkubasi, media kultur dibuang memakai mikropipet, kemudian cawan petri dicuci dengan larutan PBS dan larutan tersebut dibuang. Selanjutnya, sebanyak 0,5 mL larutan tripsin ditambah dengan merata ke dalam cawan petri, yang kemudian ditutup dan dibiarkan selama 3 menit hingga sel-sel terlepas dari permukaan. Setelah proses tersebut, media RPMI lengkap ditambah untuk menghentikan reaksi tripsin. Selanjutnya, sejumlah kecil suspensi sel diambil dan diperiksa memakai haemocytometer di bawah mikroskop untuk menghitung total sel yang diperlukan dalam pengujian. Perhitungan dilaksanakan memakai rumus sebagai berikut:

$$\text{Total sel} = \frac{\text{Total sel kuadran } 1+2+3+4}{4} \times 10^4/\text{mL}$$

Total sel yang telah dihitung kemudian ditambah ke media RPMI sampai volume total menggapai 10 mL. Selanjutnya, sebanyak 100 µL suspensi sel dipindahkan ke dalam setiap sumur pada plat 96-sumur untuk uji MTT, kemudian diinkubasikan selama semalam hingga menggapai kondisi konfluensi.

## 3. Pembuatan larutan uji

Larutan fraksi aktif daun dollu dipersiapkan dengan melarutkan 10 mg sampel ke dalam 100 µL DMSO. Larutan stok ini kemudian diencerkan secara bertahap dalam media kultur untuk menciptakan serangkaian konsentrasi, yaitu 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, dan 31,25 µg/mL, dengan masing-masing konsentrasi dilaksanakan dalam tiga replikasi.

## 4. Pengujian viabilitas sel dengan metode MTT-assay

Metabolisme dalam sel hidup merupakan dasar pendekatan ini, yang melibatkan reduksi 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida (MTT) menjadi formazan. Baik sel Vero normal maupun sel kanker payudara T47D dipakai dalam percobaan ini. Setelah sel dalam pelat 96 sumur menggapai konfluensi, sel tersebut dibilas dengan larutan PBS 1x dan dibuang. Selain itu, pelat mikro 96 sumur dipakai untuk menambahkan suspensi sel, yang kemudian diinkubasikan dalam inkubator dengan pengaturan CO<sub>2</sub> 5% selama 24 jam pada dosis masing-masing 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, dan 31,25 µg/mL. Setelah waktu inkubasi, 100 µL reagen MTT diaplikasikan ke setiap well, menyebabkan terbentuknya endapan formazan ungu, dan media kultur dibuang. Sel diinkubasikan ulang selama 4 jam pada suhu 37°C dalam inkubator dengan 5% CO<sub>2</sub> untuk menghentikan proses. Selain itu, 100 µL larutan Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 10% diaplikasikan ke setiap well. Mikroplat kemudian dibiarkan untuk diinkubasikan pada suhu kamar selama 24 jam dalam gelap, ditutup dengan kertas atau aluminium foil. Untuk mengetahui berapa banyak sel yang berhasil melewati inkubasi, kami memakai pembaca ELISA untuk mendeteksi absorbansi pada 595 nm.

Menurut Doyle et al. (2000), nilai IC<sub>50</sub> adalah ukuran potensi sitotoksitas suatu senyawa; ini didefinisikan sebagai konsentrasi di mana 50% populasi sel mengalami penghambatan pertumbuhan. Persentase kehidupan sel dihitung dari data absorbansi (Abs) yang dikumpulkan oleh pembaca ELISA untuk setiap sumur. Dengan absorbansi kontrol pelarut yang sama dengan absorbansi kontrol sel, proporsi sel yang hidup dapat ditentukan dengan memakai rumus berikut.

$$\% \text{ Viabilitas sel} = \frac{\text{Absorbansi perlakuan sampel} - \text{Absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi kontrol sel} - \text{Absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$

Persamaan regresi linier yang menggambarkan hubungan antara persentase kelangsungan hidup sel T47D dan sel Vero dengan logaritma konsentrasi sampel uji dipakai untuk menghitung nilai IC<sub>50</sub> (konsentrasi inhibitor 50%)

setelah persentase kelangsungan hidup sel didapat (Setyyawan, 2006). Jika mengetahui logaritma konsentrasi kimia ( $x$ ) dan persentase kelangsungan hidup sel ( $y$ ), Anda dapat memakai informasi tersebut untuk mendapatkan nilai IC50. Dengan membuat grafik persentase kelangsungan hidup sel terhadap logaritma konsentrasi zat uji, kita dapat memperoleh nilai IC50. Selain itu, antilog dari nilai  $x$  menciptakan nilai IC50.

#### 5. Pengukuran nilai indeks selektivitas

Indeks selektivitas atau Selectivity Index (SI) merupakan parameter yang dipakai untuk menilai tingkat selektivitas sitotoksitas suatu sampel terhadap sel kanker dibandingkan dengan sel normal. Perhitungan SI dilaksanakan dengan membandingkan nilai IC50 sampel pada kedua jenis sel tersebut. Pengujian ini dilaksanakan apabila hasil uji sitotoksitas pada sel kanker memenuhi kriteria dengan nilai IC50 kurang dari 1.000  $\mu\text{g/mL}$ . Sebaliknya, suatu senyawa dikategorikan tidak toksik apabila nilai IC50-nya melebihi 1.000  $\mu\text{g/mL}$  (Omoregie et al., 2012).

Nilai SI menggambarkan selektivitas sampel terhadap sel uji. Selektivitas efek sitotoksik ekstrak etanol terpurifikasi pada sel normal Vero dibandingkan dengan sel kanker payudara T47D dihitung memakai persamaan berikut.

$$\text{Indeks selektivitas} = \frac{\text{IC50 sel vero/normal}}{\text{IC50 sel kanker T47D}}$$

Penilaian indeks selektivitas dilaksanakan dengan membandingkan nilai IC50 pada sel Vero terhadap nilai IC50 ekstrak serta fraksi air, fraksi etil asetat, dan fraksi n-heksan pada sel T47D. Ekstrak dan fraksi daun dollu dikategorikan memiliki indeks selektivitas tinggi apabila nilai  $\text{SI} \geq 2$ , sedangkan nilai  $\text{SI} \leq 2$  memperlihatkan selektivitas yang rendah. Selain itu, semakin besar nilai indeks selektivitas pada obat antikanker yang saat ini dipakai, efek samping yang ditimbulkan cenderung meningkat, yang dapat menyebabkan pasien kanker menghentikan pengobatan kemoterapi.

#### 6. Penetapan jumlah protein p53 dan protein Bcl-2 dengan metode imunositokimia

Imunositokimia dipakai untuk memeriksa ekspresi protein p53 dan Bcl-2. Plat 24 sumur yang telah dibuat dalam cawan petri ditanami  $5 \times 10^4$  sel per sumur. Plat kemudian ditempatkan dalam inkubator dengan lingkungan 5%  $\text{CO}_2$  dan dibiarkan menginkubasi semalaman pada suhu  $37^\circ\text{C}$ . Setelah sel pulih, konsentrasi  $\frac{1}{2}$  IC50, 1x IC50, dan 2x IC50 dari fraksi paling aktif diaplikasikan pada kaca penutup, dan sel diinkubasikan sekali lagi selama 24 jam.

Selain itu, sel dikultur pada suhu  $-40^\circ\text{C}$  selama 10 menit setelah dibilas dengan PBS 1x dan difiksasi dengan metanol dingin. Tiga kali pencucian dengan air suling dan satu kali pembilasan dengan PBS dilaksanakan pada sel setelah fiksasi. Bahasa Indonesia: Setelah 10 menit deblocking dengan campuran 1:9 hidroprotein peroksida dan metanol, hingga 1 mL, peralatan dibilas dengan air dan PBS 1x. 50  $\mu\text{L}$  antibodi monoklonal primer anti-p53, yang diencerkan 1:100, ditambah setelah jam pertama inkubasi. Kemudian, dua kali, campuran dicuci dengan PBS 1x.

Setelah 20 menit inkubasi dengan 30  $\mu\text{L}$  biotin, slide dibilas dua kali dengan PBS. Kemudian, antibodi sekunder universal yang terbiotinilasi diletakkan pada slide dan dibiarkan inkubasi selama 10 menit lagi. Setelah itu, slide dibiarkan inkubasi dengan enzim streptavidin-peroksidase selama 10 menit. Kemudian dibilas dengan air suling setelah dicuci dua kali dengan PBS. Setelah itu, slide kemudian diekspos ke substrat DAB selama 5 menit. Setelah direndam selama 2 menit dalam larutan Mayer-Haematoxylin, slide dicuci dengan air suling sekali lagi. Sebelum dipasang kembali pada kaca objek dengan bahan pemasangan dan ditutup dengan slide, kaca penutup dilepas dan direndam dalam alkohol hingga kering. Mikroskop cahaya dipakai untuk memeriksa slide. Hasil positif dalam imunositokimia didefinisikan sebagai pewarnaan cokelat pada protein p53 dalam nukleus dan protein Bcl-2 dalam sitoplasma sel (Ummiyati et al., 2008).

#### Analisis Data

Untuk memulai, peneliti memakai uji normalitas Shapiro-Wilk pada data yang kami kumpulkan untuk mengetahui berapa proporsi populasi yang mengekspresikan protein p53 dan Bcl-2. Selanjutnya, kami melaksanakan uji homogenitas untuk melihat apakah variansnya seragam jika data mengikuti distribusi normal ( $P > 0,05$ ). Sebaliknya, jika data tidak mengikuti distribusi normal ( $P < 0,05$ ), uji nonparametrik dipakai untuk melanjutkan penelitian. Apabila pada tahap uji homogenitas ditemukan varians yang seragam atau homogen ( $P > 0,05$ ), maka penelitian dilanjutkan ke uji parametrik yaitu ANOVA satu arah. Langkah selanjutnya adalah melaksanakan uji Post Hoc untuk mengetahui perbedaan yang tepat antar kelompok apabila hasil uji ANOVA memperlihatkan nilai  $P > 0,05$  yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Hasil pembuatan ekstrak daun dollu**

Ekstraksi pada daun dollu dilakukan dengan metode maserasi.

Tabel 1. Hasil Persen Rendemen Ekstrak Daun Dollu

Sampel	Berat Simplisia (g)	Volume larutan (ml)	Berat Ekstrak (g)	% Rendemen
Daun dollu ( <i>Dodonaea viscosa</i> )	1005g	1500 ml +1500 ml	158g	15,72%

Hasil yang diperoleh nantinya akan dijadikan acuan dalam standarisasi tanaman obat. Jumlah hasil yang diperoleh adalah 15,72%. Jumlah hasil ini tidak jauh berbeda dengan penelitian Sendana (2021) tentang daun dollu di mana hasil yang diperoleh sebesar 17,2%. Menurut Sapri *et al.* (2014), semakin halus bahan yang digunakan, semakin luas medan kontak antara bahan dan pelarut sehingga semakin banyak hasil yang dihasilkan dalam proses ekstraksi. Menurut Harborne (2006), kelas alkohol adalah pelarut serbaguna yang baik

untuk ekstraksi awal karena dianggap mampu menarik hampir semua komponen, baik polar, semi-polar, maupun nonpolar.

**Hasil pembuatan Fraksinasi daun dollu**

Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan pelarut dengan tingkat polaritas yang berbeda. Fraksinasi bertujuan untuk menarik semua senyawa kimia pada tumbuhan berdasarkan polaritas masing-masing senyawa. Fraksinasi dilakukan karena ekstrak yang diperoleh masih berupa senyawa campuran.

Tabel 2. Persentase Rendemen Ekstrak dan Fraksi Daun Dollu

No.	Sampel	Ekstrak yang digunakan	Hasil berat fraksi	Rendemen %
1	Fraksi n-Heksan	50g	2g	4
2	Fraksi Etil Asetat	50g	38g	76
3	Fraksi Air	50g	7g	14

Tabel 2 menunjukkan berat setiap fraksi yang diperoleh berdasarkan pelarut yang digunakan. Berat fraksi yang diperoleh sangat dipengaruhi oleh pelarut yang digunakan. Pelarut yang digunakan dalam proses fraksinasi didasarkan pada urutan polaritasnya, mulai dari pelarut n-heksana, diikuti oleh pelarut etil asetat dan metanol air. Fraksi n-heksana memiliki nilai fraksinasi daun dollu terendah yaitu 4%, diikuti oleh fraksi air sebesar 14%, dan fraksi etil asetat sebesar 76%. Menurut Purwanto (2015), hasil fraksinasi yang diperoleh menunjukkan nilai yang berbeda karena perbedaan nilai polaritas

masing-masing gugus senyawa kimia. Senyawa yang berasal dari tumbuhan memiliki polaritas yang berbeda yang disebabkan oleh perbedaan struktur dan ikatan kimia yang dimilikinya.

**Hasil Identifikasi Kualitatif Kandungan Ekstrak Daun dollu**

Flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, terpenoid, dan bahan kimia steroid diidentifikasi dari ekstrak daun dollu memakai reaksi warna untuk identifikasi kelompok senyawa. Anda dapat melihat hasilnya di tabel

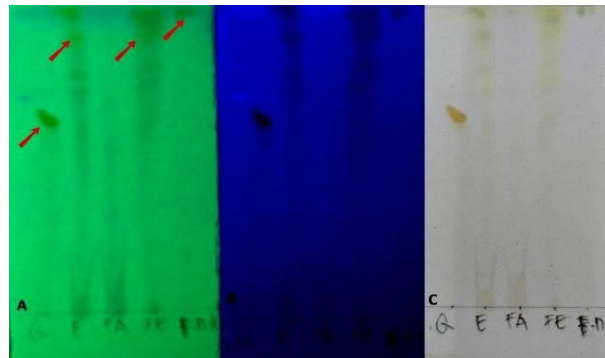
Tabel 2. Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Dollu

No.	Kandungan	Hasil percobaan	Pustaka
1	Flavonoid	Positif, terbentuk warna jingga	Warna merah, kuning atau jingga (Depkes 1979)
2	Alkaloid	Mayer : endapan putih Dragendorff : endapan jingga Wagner : endapan coklat	Terbentuk endapan berwarna coklat sampai hitam (Depkes RI, 1997)
3	Saponin	Positif, berbentuk buih	Terbentuk buih selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm pada penambahan HCl 2N buih tidak hilang (Depkes 1977)
4	Tannin	Positif, terbentuk warna hijau Kehitaman	Warna hijau kehitaman terbentuk (Franswort, 1996; Noer & Pratiwi, 2016).
5	Steroid	Positif Steroid : Hijau	Terbentuk cincin berwarna merah kecoklatan atau ungu, dengan larutan berwarna hijau atau ungu (Depkes, 1987).

### Hasil Identifikasi KLT golongan Flavonoid

Analisis kandungan senyawa flavonoid dilaksanakan dengan memakai kromatografi lapis tipis (KLT) yang memanfaatkan fase gerak berupa campuran kloroform dan metanol dengan

perbandingan 4:1 serta fase diam berupa silika gel GF254. Untuk mendeteksi keberadaan bercak senyawa flavonoid, dipakai pereaksi sitoborat sebagai indikator.



Gambar 1. Hasil Identifikasi Golongan Flavonoid secara KLT Dengan Sinar UV 254 (A); Sinar UV 366 (B); dan Visible Dengan Penampak Bercak (C)

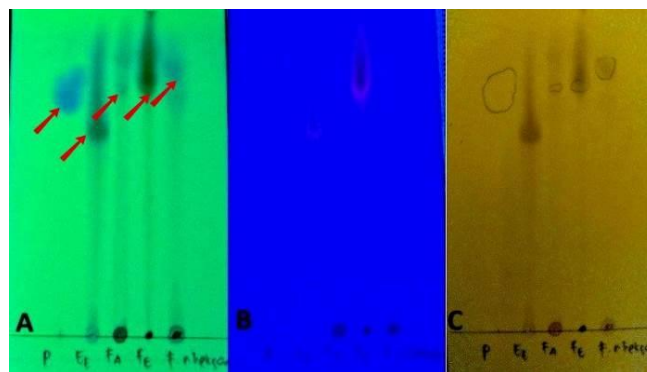
Tabel 2. Hasil Identifikasi Golongan Flavonoid secara KLT

No.	Sampel	Rf	UV 254	UV366	Penampak Bercak	Ket
1	Ekstrak	0,91	Kuning	Merah	Hijau kekuningan	Positif flavonoid
2	Fraksi air	-	-	-	-	Negatif flavonoid
3	Fraksi etil asetat	0,91	Kuning	Merah	Hijau kekuningan	Positif flavonoid
4	Fraksi n-heksan	0,96	Kuning	Merah	Hijau kekuningan	Positif flavonoid

### Hasil Identifikasi KLT golongan Alkaloid

Analisis komposisi kimia senyawa alkaloid dengan memakai fase gerak metanol:amonium hidroksida (100:3) yang digandengkan dengan fase

diam silika gel GF254, yaitu reagen deteksi bercak dragendrof.



Gambar 2. Hasil Identifikasi Golongan Alkaloid secara KLT Dengan Sinar UV 254 (A); Sinar UV 366 (B); dan Visible Dengan Penampak Bercak (C)

Setelah pemberian reagen, muncul bercak jingga, dan nilai Rf untuk setiap bercak ditunjukkan pada Gambar 8 dan Tabel 3, yang memperlihatkan hasil positif untuk alkaloid. Penggunaan reagen

dragendrof menyebabkan senyawa memperlihatkan warna mulai dari jingga hingga coklat (Ahmad et al., 2017).

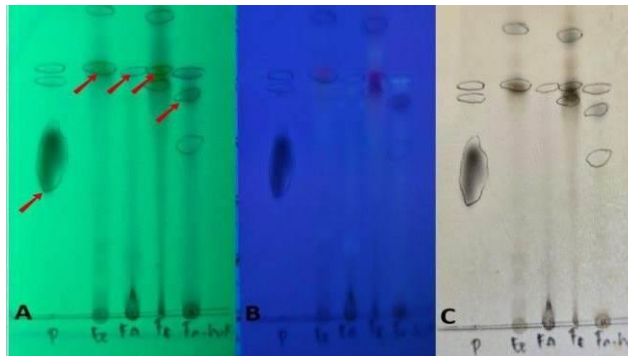
Tabel 3. Hasil Identifikasi Golongan Alkaloid secara KLT

Sampel	Rf	UV 254	UV366	Penampak Bercak	Ket
Ekstrak	0,69	Biru	Merah muda	Kuning kecoklatan	Positif alkaloid
Fraksi air	0,76	Hijau kecoklatan	-	Kuning kecoklatan	Positif alkaloid
Fraksi etil asetat	0,76	Hijau kecoklatan	Merah muda	Kuning kecoklatan	Positif alkaloid
Fraksi n-heksan	0,73	Biru	Merah muda	Kuning kecoklatan	Positif alkaloid

### Hasil Identifikasi KLT golongan Tanin

Menurut Masriani et al. (2023), ketika komposisi kimia senyawa tanin diperiksa memakai fase gerak yang terdiri dari etil asetat: kloroform (7:3)

dan fase diam silika gel GF254, reagen deteksi bercak memakai FeCl<sub>3</sub> akan menciptakan warna coklat kehitaman.



Gambar 3. Hasil Identifikasi Golongan Tanin secara KLT Dengan Sinar UV 254 (A); Sinar UV 366 (B); dan Visible Dengan Penampak Bercak (C)

Bercak-bercak tersebut berubah menjadi coklat kehitaman setelah terpapar reagen, dan nilai Rf untuk setiap bercak ditunjukkan pada Gambar 3

dan Tabel 4, yang memperlihatkan yaitu temuan tersebut positif terhadap tanin.

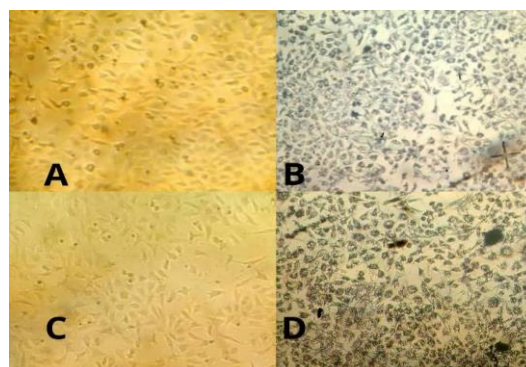
Tabel 4. Hasil Identifikasi Golongan Tanin secara KLT

No.	Sampel	Rf	UV 254	UV366	Penampak Bercak	Ket
1	Ekstrak	0,72	Hijau	Merah muda	Hitam	Positif tanin
2	Fraksi air	0,72	Biru	-	Hitam	Positif tanin
3	Fraksi etil asetat	0,72	Hijau	Merah muda	Hitam	Positif tanin
4	Fraksi n-heksan	0,67	Hijau	Merah muda	Hitam	Positif tanin

### Hasil Uji Aktivitas Sitotoksik dengan Metode MTT

Sebuah studi antikanker dilaksanakan untuk menilai kemanjuran ekstrak dan fraksi daun dollu dalam mengurangi proliferasi sel kanker payudara T47D. Tiga replikasi dipakai, dengan dosis berkisar antara 500 hingga 31,25 µg/mL, yang dilarutkannya pada DMSO. Untuk menjamin yaitu temuan tersebut tidak terpengaruh, DMSO dipakai pada dosis rendah untuk melarutkan bahan kimia uji yang tidak larut dan formazan. Percobaan dilaksanakan dalam pengaturan laboratorium terkendali dengan memakai sel T47D dan sel vero sebagai sel referensi.

Sel T47D dikultur dalam medium RPMI-1640, yang kaya akan glukosa, sedangkan sel vero dikultur dalam DMEM, yang kaya akan asam amino. Aktivitas sitotoksik diamati melalui uji MTT, di mana sel hidup mereduksi MTT menjadi formazan berwarna ungu; intensitas warna mencerminkan viabilitas sel, karena berkaitan dengan aktivitas enzim dehidrogenase dalam sel hidup. Morfologi sel juga diamati, memperlihatkan sel T47D berbentuk poligonal dan tebal, sedangkan sel vero poligonal dan pipih, yang keduanya mengecil dan berwarna ungu setelah perlakuan MT.



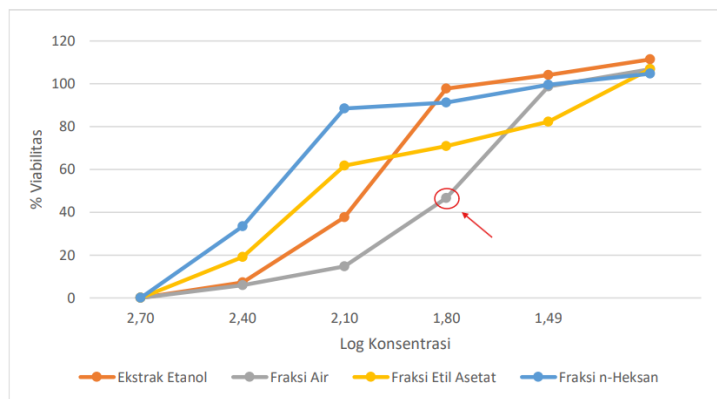
Gambar 4. Morfologi Sel Vero (A); Sel Vero Setelah Di Berikan MTT (B); Sel Kanker Payudara T47D (C); Sel Kanker Payudara T47D Setelah Di Berikan MTT (D)

Karena formazan tidak larut dalam air atau media kultur, Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) dipakai untuk melarutkannya. Namun, setelah inkubasi dengan MTT, sel-sel yang masih aktif secara metabolik menciptakan molekul formazan berwarna ungu. Untuk mendapatkan pembacaan yang benar dari formazan, SDS melarutkannya dan mendenaturasi protein. Mikroplat dibiarkan dalam lingkungan gelap selama 24 jam setelah menambahkan SDS, dan kemudian absorbansi diukur pada panjang gelombang 595 nm memakai pembaca ELISA. Kapasitas sel untuk mengubah MTT menjadi formazan, seperti yang terlihat dari absorbansi yang tinggi, adalah ukuran total sel yang hidup.

Investigasi mengungkapkan yaitu absorbansi kurang dari 31,25 µg/mL pada konsentrasi 500 µg/mL, yang memperlihatkan yaitu jumlah yang tinggi berbahaya dan mengganggu metabolisme sel, sementara sel tetap aktif pada konsentrasi rendah. Kita dapat mengetahui nilai IC50 untuk setiap sampel dan persentase sel hidup memakai data absorbansi ini.

**Hasil perhitungan konsentrasi terhadap persentase viabilitas**

Gambar 5 memperlihatkan yaitu proporsi sel T47D yang hidup yang terpapar ekstrak dan fraksi daun dollu bervariasi menurut konsentrasi; konsentrasi yang lebih besar menciptakan persentase sel kanker payudara T47D yang hidup lebih rendah



Gambar 5. Grafik Hubungan Log Konsentrasi Terhadap Persen Viabilitas

Intensitas warna formazan yang terbentuk berkorelasi langsung dengan total sel hidup, sehingga nilai absorbansi dapat diubah menjadi persentase viabilitas sel dan diplot terhadap log konsentrasi senyawa untuk memperoleh persamaan regresi linear ( $y = ax + b$ ). Grafik scatter ini menggambarkan pengaruh konsentrasi senyawa terhadap viabilitas sel, dimana nilai IC50 ditentukan dengan memasukkan  $y = 50\%$  ke dalam persamaan regresi untuk mencari nilai  $x$  dan menghitung antilognya. Nilai IC50 merepresentasikan konsentrasi senyawa yang mampu menghambat 50%

viabilitas sel; semakin rendah nilai IC50, semakin tinggi potensi sitotoksiknya. Berdasarkan klasifikasi potensi, IC50 kurang dari 20 µg/mL dikategorikan sangat toksik, 20–100 µg/mL toksik dengan potensi sedang, 100–200 µg/mL memperlihatkan aktivitas moderat, 200–1000 µg/mL tergolong lemah, dan lebih dari 1000 µg/mL dianggap tidak efektif sebagai agen antikanker. Apabila fraksi air ada di posisi tengah kurva, hal ini mengindikasikan yaitu senyawa tersebut memiliki kemampuan penghambatan viabilitas sel yang sedang.

Tabel 5. Hasil Perhitungan IC50 Sel T47D

No.	Sampel	Nilai IC50 (µg/mL)			Rata-Rata IC50
		Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	
1	Ekstrak Etanol	205,26	223,01	219,85	216,04±9,47
2	Fraksi Air	149,10	145,13	125,30	139,84±12,74*
3	Fraksi Etil Asetat	233,52	243,13	232,51	236,39±5,85
4	Fraksi n-Heksan	512,57	629,32	638,82	593,57±70,30

Berlandaskan data pada Tabel 5, fraksi air daun dollu memperlihatkan aktivitas sitotoksik dengan nilai IC50 sebesar 139,8 µg/mL, yang masuk dalam kategori toksisitas sedang (21–200 µg/mL).

Sebaliknya, ekstrak etanol dan fraksi etil asetat memiliki nilai IC50 masing-masing sebesar 236,39 µg/mL dan 216,4 µg/mL, yang memperlihatkan aktivitas sitotoksik tergolong lemah (201–500

µg/mL). Sementara itu, fraksi n-heksan dengan nilai IC50 sebesar 593,57 µg/mL diklasifikasikan sebagai toksisitas sangat rendah atau hampir tidak toksik (IC50 > 501 µg/mL). Aktivitas antikanker pada fraksi air diduga terkait dengan kandungan senyawa flavonoid, alkaloid, dan tanin, di mana flavonoid dan

alkaloid berperan dalam induksi apoptosis serta penghambatan proliferasi sel kanker, sedangkan tanin turut memberikan kontribusi melalui efek penghambatan pertumbuhan dan pemicu kematian sel kanker.

Tabel 6. Hasil Perhitungan IC<sub>50</sub> Sel Vero

No.	Sampel	Nilai IC <sub>50</sub> (µg/mL)			Rata-Rata IC <sub>50</sub>
		Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	
1	Ekstrak Etanol	396,44	403,33	432,54	410,77±19,16
2	Fraksi Air	346,79	382,64	373,79	367,74±18,67
3	Fraksi Etil Asetat	419,80	440,81	397,85	419,49±21,47
4	Fraksi n-Heksan	865,04	1043,66	980,13	962,95±90,55

Uji selektivitas dilaksanakan pada lini sel tumor T47D dan lini sel normal Vero. Sebagai hasil dari uji sitotoksitas sel kanker, nilai IC50 yang didapat kurang dari 1.000 µg/ml, maka dalam selektivitas cuplikan. Indeks selektivitas membandingkan sel normal (sel vero) dengan sel spesifik tumor (T47D) untuk menentukan sejauh mana selektivitas spesifik tumor (ekstrak) hadir.

#### Hasil Indeks selektivitas sel T47D dan sel vero

Selektivitas agen kemopreventif merujuk pada kemampuan senyawa untuk secara spesifik membunuh sel kanker tanpa menimbulkan kerusakan pada sel normal. Hal ini berbeda dengan

kemoterapi konvensional yang cenderung menyerang baik sel kanker maupun sel normal, sehingga berpotensi menimbulkan efek samping. Oleh karena itu, ekstrak atau fraksi tanaman yang diuji diharapkan memperlihatkan aktivitas sitotoksik yang tinggi terhadap sel kanker dan rendah terhadap sel normal. Parameter keberhasilan uji sitotoksik ditunjukkan oleh nilai IC50 yang rendah pada sel kanker dan nilai IC50 yang tinggi pada sel normal. Indeks selektivitas (selectivity index) dipakai sebagai ukuran keamanan senyawa, dengan nilai yang dianggap tinggi apabila lebih dari 2.

Tabel 7. Hasil Nilai Indeks Selektivitas Sel Vero Terhadap Sel Kanker T47D

No.	Sampel	IC <sub>50</sub> Sel Vero (µg/mL)	IC <sub>50</sub> Sel T47D (µg/mL)	Nilai Indeks Selektivitas
1	Ekstrak Etanol	410,77	216,04	2
2	Fraksi Air	367,74	139,84	3*
3	Fraksi Etil Asetat	419,49	236,39	2
4	Fraksi n-Heksan	962,95	593,57	2

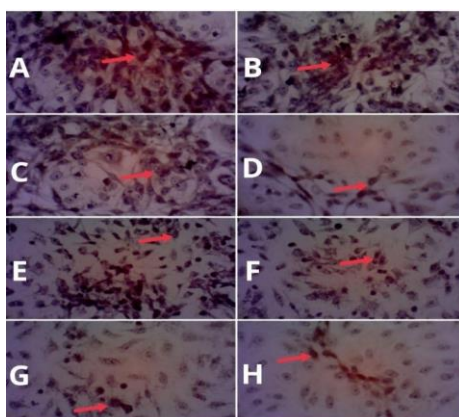
Berlandaskan Tabel 7, fraksi air dari daun dollu memiliki indeks selektivitas sebesar 3, memperlihatkan selektivitas tinggi karena nilainya >2. Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat meskipun bersifat toksik lemah terhadap sel T47D, memiliki indeks selektivitas yang sama, menandakan tingkat keamanan yang baik terhadap sel normal dan sel kanker. Fraksi n-heksan memiliki nilai IC50 yang memperlihatkan toksisitas sangat rendah atau hampir tidak toksik, dengan indeks selektivitas yang juga memperlihatkan tingkat keamanan yang baik.

#### Hasil Uji Ekspresi p53 dan Bcl-2 dengan Metode Imunositokimia

Imunositokimia didasarkan pada mekanisme pengikatan spesifik antara protein target dengan antibodi berlabel, di mana substrat kromoprotein DAB mengalami perubahan warna

menjadi coklat sebagai indikasi ekspresi protein. Pada riset ini, antibodi dipakai untuk mengidentifikasi ekspresi protein p53 dan Bcl-2 pada sel kanker payudara T47D yang diberikan perlakuan fraksi air daun dollu pada tiga konsentrasi berbeda, yaitu ½ IC50, 1×IC50, dan 2×IC50. Protein p53 memiliki peran krusial dalam regulasi siklus sel dan induksi apoptosis, sedangkan protein Bcl-2 berfungsi sebagai penghambat apoptosis dan mendukung kelangsungan hidup sel. Ketidakseimbangan ekspresi kedua protein tersebut berkontribusi pada patogenesis kanker, contohnya overekspresi Bcl-2 yang menyebabkan resistensi sel kanker terhadap kematian. Ekspresi protein positif ditandai dengan pewarnaan coklat pada sitoplasma, inti sel, atau membran, sedangkan pewarnaan biru atau ungu memperlihatkan tidak adanya ekspresi protein.

Seluruh hasil diamati memakai mikroskop cahaya dan dianalisis dengan perangkat lunak ImageJ.



Gambar 6. Hasil Pengamatan Ekspresi protein p53 dan Bcl-2 Sel T47D; 2xIC50 Protein p53 (A); IC50 Protein p53 (B); ½ IC50 Protein p53 (C); Sel Kontrol protein p53 (D); 2xIC50 Protein Bcl-2 (E); IC50 Protein Bcl-2 (F); ½ IC50 Protein Bcl-2 (G); Sel Kontrol Protein Bcl-2(H)

Tabel 8. Hasil Persen Ekspresi p53 di Analisis Secara Semikuantitatif memakai Software *ImageJ*

Perlakuan	Konsentrasi (µg/mL)	Rata-rata Ekspresi protein p53	Persentase rata-rata ekspresi protein p53 (%)	Rata-rata EC50 (µg/mL)
Fraksi Air Daun Dollu	½IC <sub>50</sub> (69,9 µg/mL)	10,74±3,08	149,67±71,5	44,41±7,09 µg/mL
	1xIC <sub>50</sub> (139,8 µg/mL)	10,91±2,64	153,71±61,47	
	2xIC <sub>50</sub> (279,6 µg/mL)	11,21±2,90	160,74±67,35	
Kontrol Positif		8,04±1	86,91±16,88	
Kontrol sel		4,30		

Tabel 9. Hasil persen Ekspresi Bcl-2 di Analisis Secara Semikuantitatif Memakai Software *ImageJ*

No.Perlakuan	Konsentrasi (µg/mL)	Rata-rata Ekspresi protein Bcl-2	Persentase rata-rata ekspresi protei Bcl-2 (%)	Rata-rata EC50 (µg/mL)
1 Fraksi Air Daun dollu	½IC <sub>50</sub> (69,9 µg/mL)	14,48±3,26	39,43±32,26	193,22 ±20,99 µg/mL
	1xIC <sub>50</sub> (139,8 µg/mL)	13,95±3,21	38,11±31,83	
	2xIC <sub>50</sub> (279,6 µg/mL)	13,28±2,97	31,45±29,44	
2 Kontrol Positif		6,78±2,03	39,44±7,10	
3 Kontrol sel		10,10		

Data pada Tabel 8 memperlihatkan yaitu pemberian fraksi air daun dollu mampu meningkatkan ekspresi protein p53 pada sel kanker payudara T47D secara konsentrasi-dependen. Rata-rata ekspresi protein p53 meningkat seiring dengan bertambahnya konsentrasi fraksi yang diberikan. Pada kelompok kontrol, ekspresi p53 sebesar 86,91±16,88 µg/mL, sedangkan pada perlakuan ½ IC50 meningkat menjadi 149,67±71,5 µg/mL, pada IC50 menjadi 153,71±61,47 µg/mL, dan pada 2×IC50 menggapai 160,74±67,35 µg/mL. Hasil ini memperlihatkan adanya aktivasi protein p53 sebagai respons terhadap perlakuan fraksi air daun dollu. Data didapat dari kuantifikasi gambar rata-rata lima

lapang pandang memakai metode image quantification.

Analisis statistik memakai perangkat lunak SPSS mengindikasikan yaitu data ekspresi protein p53 pada perlakuan fraksi air daun Dollu terhadap sel kanker payudara T47D memenuhi asumsi distribusi normal (nilai Sig > 0,05) dan homogenitas varians (nilai Sig = 0,465 > 0,05), sehingga pengujian parametrik dapat diterapkan.

Hasil uji One Way ANOVA mengungkapkan perbedaan signifikan pada ekspresi p53 antar kelompok perlakuan (Sig = 0,000 < 0,05), yang kemudian dianalisis lebih lanjut memakai uji Post Hoc Tukey. Uji ini memperlihatkan adanya

perbedaan signifikan antara kontrol positif dengan konsentrasi IC<sub>50</sub> dan 2xIC<sub>50</sub>, serta antara konsentrasi ½ IC<sub>50</sub> dengan IC<sub>50</sub> dan 2xIC<sub>50</sub>. Namun, tidak terdapat perbedaan signifikan antara kontrol positif dengan ½ IC<sub>50</sub> (Sig = 1,000) maupun antara konsentrasi IC<sub>50</sub> dengan 2xIC<sub>50</sub> (Sig = 0,057). Rata-rata peningkatan ekspresi gen p53 memperlihatkan tren peningkatan seiring dengan bertambahnya konsentrasi, dengan perbedaan paling menonjol terjadi antara kontrol positif dan konsentrasi 2xIC<sub>50</sub>. Temuan ini menegaskan yaitu fraksi air daun Dollu secara signifikan meningkatkan ekspresi p53 secara konsentrasi-dependen, khususnya pada konsentrasi IC<sub>50</sub> dan 2xIC<sub>50</sub>.

Hasil kuantifikasi citra mengindikasikan yaitu ekspresi protein Bcl-2 pada sel kanker payudara T47D yang diberi perlakuan fraksi air daun Dollu mengalami penurunan ringan sejalan dengan peningkatan konsentrasi, yaitu dari 39,43±32,26 pada konsentrasi ½ IC<sub>50</sub> menjadi 31,45±29,44 pada konsentrasi 2x IC<sub>50</sub>, jika dibandingkan dengan kontrol positif yang memiliki nilai 39,44±7,10. Analisis normalitas memakai uji Shapiro-Wilk memperlihatkan yaitu data ekspresi Bcl-2 tidak terdistribusi secara normal (Sig < 0,05), sehingga analisis dilanjutkan dengan uji non-parametrik Kruskal-Wallis.

Uji tersebut mengungkapkan adanya perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan (Asymp. Sig = 0,022 < 0,05), khususnya antara kelompok IC<sub>50</sub> dan ½ IC<sub>50</sub> (Adj. Sig = 0,013 < 0,05) berlandaskan uji Post Hoc Dunnett. Berlandaskan nilai EC<sub>50</sub>, fraksi air memperlihatkan potensi yang lebih tinggi dalam menginduksi ekspresi p53 (EC<sub>50</sub> = 44,41 µg/mL) dibandingkan kemampuannya menekan ekspresi Bcl-2 (EC<sub>50</sub> = 193,22 µg/mL) (Tabel 9). Hal ini memperlihatkan yaitu konsentrasi fraksi air yang relatif rendah sudah efektif dalam merangsang ekspresi p53, sementara konsentrasi yang lebih tinggi diperlukan untuk menurunkan ekspresi Bcl-2. Temuan ini mengindikasikan yaitu fraksi air daun Dollu lebih efektif berperan sebagai agen pro-apoptotik melalui jalur p53 dibandingkan sebagai penghambat mekanisme kelangsungan hidup sel melalui Bcl-2.

Ekstrak etanol serta fraksi air, etil asetat, dan n-heksan dari daun dollu mengandung senyawa flavonoid, tanin, dan alkaloid. Flavonoid memiliki kemampuan untuk mengaktifkan protein p53, yang berperan dalam penghentian siklus sel dan induksi apoptosis pada sel yang mengalami kerusakan DNA. Mekanisme ini dapat mempercepat proses perbaikan DNA atau mengeliminasi sel yang tidak dapat

diperbaiki, sehingga mencegah perkembangan kanker dengan cara menghambat proliferasi sel kanker serta mencegah pembelahan sel yang tidak terkontrol. Dengan demikian, flavonoid memperlihatkan potensi sebagai agen kemopreventif melalui aktivasi protein p53, yang berfungsi dalam menghambat pertumbuhan sel kanker, meningkatkan perbaikan DNA, dan memicu apoptosis pada sel yang rusak.

Namun, penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengklarifikasi mekanisme spesifik serta efektivitas flavonoid dalam terapi kanker yang berfokus pada jalur p53 (Yang, Y., et al., 2014). Selain itu, tanin juga diketahui dapat meningkatkan ekspresi p53 pada sel kanker, mengaktifkan jalur apoptosis, serta menghentikan siklus sel, sehingga memberikan waktu bagi proses perbaikan DNA dan menghambat proliferasi sel kanker (Zhao, 2014).

Beberapa jenis alkaloid diketahui mampu mengaktifkan protein p53, yang berfungsi untuk menginduksi apoptosis serta menghentikan siklus pembelahan pada sel kanker. Selain itu, alkaloid tersebut juga berperan dalam mengatur ekspresi gen-gen yang terlibat dalam proses perbaikan DNA dan pengendalian siklus sel (Zhao, 2014). Doxorubicin merupakan agen kemoterapi dari kelas antrasiklin yang dipakai dalam pengobatan berbagai jenis kanker (Muggia *et al.*, 2015), Berfungsi secara analog dengan sampel yang diuji, doxorubicin menginduksi apoptosis melalui jalur intrinsik yang diawali dengan aktivasi protein p53, yang selanjutnya menurunkan ekspresi protein anti-apoptotik Bcl-2, sehingga mempermudah proses kematian sel kanker (Tornatore *et al.*, 2019 : Gioia *et al.*, 2017).

## KESIMPULAN

Ekstrak etanol, fraksi air, fraksi etil asetat, dan fraksi n-heksan daun dollu (*Dodonaea viscosa* Jacq) memperlihatkan aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D dengan nilai IC<sub>50</sub> masing-masing 216,04 µg/mL; 139,84 µg/mL; 236,39 µg/mL; dan 593,57 µg/mL. Selektivitas tertinggi terdapat pada fraksi air dengan indeks selektivitas 3, sedangkan ekstrak etanol, fraksi n-heksan, dan fraksi etil asetat memiliki indeks selektivitas sebesar 2. Fraksi air daun dollu juga efektif meningkatkan protein p53 dengan nilai EC<sub>50</sub> 44,41 µg/mL dan menghambat protein Bcl-2 dengan nilai EC<sub>50</sub> 193,22 µg/mL.

Disarankan untuk melaksanakan penelitian lanjutan guna mengeksplorasi senyawa aktif dan mekanisme antikanker daun dollu terhadap sel kanker T47D selain aktivitas p53 dan Bcl-2 yang telah ditunjukkan, serta melaksanakan riset in vivo pada

hewan coba untuk mengkaji efektivitas daun dollu dalam menghambat pertumbuhan kanker payudara.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, I., Rissyelly, A. K., & Mun'Im, A. (2017). Screening of extraction method for alkaloid enrichment of *Peperomia pellucida* (L.) Kunth. *Asian J Pharm Clin Res*, 7(10), 214–219.
- AL-Oraimi, A.A., Hossain, M. . (2016). In vitro total flavonoids content and antimicrobial capacity of different organic crude extracts of *D. Viscosa*. *J. Biol. Active Prod. Nat*, 2(6), 150–165.
- B, A. (2001). ). *Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim, the mitochondria*, *Cell Tissue Res*.
- Chrystomo, L. Y., Karim, A. K., Antari, N. N., Wona, Y., & Pongtiku, A. (2016). *Buku Tumbuhan Kerarifan Lokal Papua/Papua Traditional Medicine Herbs*.
- Freshney, R. I. (2010). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*.
- Gibbs JB. (2000). *Anticancer drug targets: growth factors and growth factors signaling*. 105, 9 – 13.
- Hanahan D and Weinberg RA. (2000). Faktor Risiko Kanker Payudara pada Wanita Usia Subur di RSUD Dr. Pirngadi Medan. *Jurnal Kesehatan Global*, 1(1), 8-14.
- Harborne, J. B. (1987). *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soedira*.
- Masriani, M., Parawansa, K. A., Sasri, R., Sapar, A., Erlina, E., & Ersando, E. (2023). The Effect of Different Solvents on Total Tannin Content of Cengkodok (*Melastoma malabathricum*) Leaf Extracts. *Jurnal Kependidikan Kimia*, 6(11), 821.
- Muggia, F. M. (2015). Doxorubicin in Cancer Therapy: Clinical Overview. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2(75), 401–406.
- Mulyadi. (1998). *Karsinogen, Karsinogenesis dan Antikanker*.
- Rather R.A., B. M. (2019). Quercetin as an innovative therapeutic tool for cancer chemoprevention: Molecular mechanisms and implications in human health. *Cancer Med*.
- Tornatore, C. S. (2019). Mechanisms of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity and Apoptosis. *Journal of Pharmacology*, 864, 32-42.
- Umniyati, S.R., Sutaryo, Wahyono, D., Artama, W. . (2008). Application of monoclonal antibody DSSC7 for early detection of dengue infection in blood smear preparation based on immunocytochemical streptavidin biotin peroxidase complex assay. In . *Frontier Sciences from gene to application*.
- Venkatesh, S., Reddy, Y.S.R., Ramesh, M., Swamy, M.M., Mahadevan, N., Suresh, B. (2008). Pharmacognostical studies on *Dodonaea viscosa* leaves. *Pharmacol*, 4(2), 83–88.
- Zhao, L. (2014). *Berberine-induced apoptosis and p53 activation in human colon cancer cells*.