

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN SITOTOKSIK FRAKSI ETANOL BUNGA  
ROSELLA (*Hibiscus sabdariffa* L.) TERHADAP SEL KANKER KOLON WiDr  
SECARA *IN VITRO* DAN *IN SILICO***

**ANTIOXIDANT AND CYTOTOXIC ACTIVITY TEST OF ETHANOL FRACTION  
ROSELLE CALYX (*Hibiscus sabdariffa* L.) AGAINST COLON CANCER CELL  
WiDr BY *IN VITRO* AND *IN SILICO***

**B. Innya Untari Afriana\***

Department of Pharmacy, Faculty of Medicine and Health Sciences  
Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

\* [innyauntari@gmail.com](mailto:innyauntari@gmail.com)

**ABSTRACT**

The incidence of colon cancer in Indonesia is relatively high. Colon cancer treatment has many side effects. Therefore it needs to develop colon cancer drugs from natural ingredients such as roselle calyx (*Hibiscus sabdariffa* L.) as chemopreventif to increase efficacy and reduce the side effects. This study aims to know potential of ethanol fraction of roselle calyx (FEBR) that contains flavonoid cyanidin-3-sambubioside as antioxidant, cytotoxic and ability to inhibit the growth of cancer cells.

The methode used are *in vitro* and *in silico*. Roselle calyx maserated and fractionated Thin layer Chromatography (TLC) used to identification flavonoid in FEBR qualitatively. Antioxidant Test FEBR measured by DPPH. Cytotoxicity test in WiDr cell line to find out cell viability by MTT Assay method. Life cycle of each cell is analyzed to find out the cell cycle phase with Flowsitometric method. Molecular docking of FEBR with active compound cyandin 3-sambubioside in IKK and VEGF with Autodock Vina method.

The TLC result for flavonod in FEBR showed dark violet and violet spot in UV 366. Antioxidant and cytotoxic test of FEBR have weak ability with each  $IC_{50}$  428  $\mu\text{g/ml}$  and 3127  $\mu\text{g/ml}$ . Cell cycle inhibition on each cell occurs in the M1 phase. Molecular docking's results showed that inhibitory activity of FEBR in IKK and VEGF with affinity energy -9.6 kcal/mol dan -6.7 kcal/mol.

**Keywords :** Roselle calyx's ethanol fraction, WiDr cell line, antioxidant test, cytotoxic test, molecular docking.

## INTISARI

Tingkat kejadian kanker kolon di Indonesia tergolong tinggi. Pengobatan kanker kolon mengakibatkan banyak efek samping. Oleh karena itu perlu dilakukan pengembangan obat kanker kolon dari bahan alam yang potensial seperti bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) sebagai kemopreventif untuk memaksimalkan efikasi dan meminimalkan efek samping yang akan timbul. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui potensi fraksi etanol bunga rosella (FEBR) yang mengandung flavonoid sianidin 3-sambubioside sebagai antioksidan, sitotoksik dan menghambat pertumbuhan kanker kolon melalui penghambatan siklus sel.

Metode penelitian dilakukan secara *in vitro* dan *in silico*. Ekstrak etanol bunga rosella dimaserasi dan difraksinasi. FEBR diidentifikasi dengan KLT untuk mengetahui kandungan senyawa secara kualitatif. Uji antioksidan dengan metode DPPH untuk mengetahui efek antioksidan dari FEBR. Uji sitotoksik pada sel WiDr untuk mengetahui viabilitas sel dengan metode MTT Assay. Daur hidup dari masing-masing sel selanjutnya dianalisis untuk mengetahui fase daur sel yang terhambat pertumbuhannya setelah diberi perlakuan FEBR dengan metode *flowcytometri*. *Molecular docking* senyawa FEBR yaitu sianidin 3-sambubioside terhadap protein IKK dan VEGF dengan *Autodock Vina*.

Hasil identifikasi KLT senyawa flavonoid dalam FEBR ditunjukkan dengan bercak ungu tua dan ungu muda pada UV 366. Kemampuan antioksidan FEBR lemah dengan nilai  $IC_{50}$  428  $\mu\text{g/mL}$ . Uji sitotoksik pada sel kanker kolon WiDr menghasilkan nilai  $IC_{50}$  sebesar 3127  $\mu\text{g/mL}$  yang tergolong lemah. Hasil menunjukkan penghambatan siklus sel pada masing-masing sel terjadi pada fase M1. Uji *in silico* dengan protein target IKK, dan VEGF nilai *docking score* yang diperoleh antara sianidin 3-sambubioside dengan protein IKK dan VEGF sebesar -9.6 kcal/mol dan -6.7 kcal/mol.

**Kata Kunci:** fraksi etanol bunga rosella, sel WiDr, uji antioksidan, uji sitotoksik, *molecular docking*

## PENDAHULUAN

Kanker kolorektal merupakan kanker yang berasal dari kolon maupun rektal (PNPK, 2017) dan masih tak terkendali (Bardhan & Liu, 2013). Di Amerika Serikat kanker kolon menduduki peringkat keempat sebagai kanker yang kerap terdiagnosa dan peringkat kedua sebagai penyebab kematian terbanyak (*National Comprehensive Cancer Network*, 2017). Berdasarkan data GLOBOCAN 2012, tingkat kejadian kanker kolon di Indonesia mencapai angka 12,8 per 100 ribu orang usia dewasa dan tingkat kematian 9,5 dari seluruh kanker. Pada beberapa penelitian klinis epidemiologi kanker kolorektal di Indonesia usia penderita berkisar antara umur 45-50 tahun, dengan rata-rata sekitar 47 tahun (Abdullah *et al.*, 2012). pengobatan kanker terbatas pada tindakan medis seperti pembedahan, radiasi dan kemoterapi (Arifianti L *et al.*, 2014). Pengobatan secara medis terbukti dapat mengurangi bahkan menyembuhkan kanker, namun efek samping yang ditimbulkan dapat merugikan pasien. Efek samping yang sering muncul seperti gangguan nutrisi, gangguan rasa kecap, berat badan menurun, anemia, metabolisme karbohidrat, protein dan lemak terganggu (Hardiano *et al.* 2015). Berdasarkan hal tersebut perlu dilakukan pengembangan potensi bahan alam sebagai alternatif pengobatan kanker dengan efek samping yang lebih rendah. Pemanfaatan bahan alam sebagai pengobatan alternatif sudah tidak asing lagi. Bahkan, salah satu obat kanker yang biasa digunakan yakni vinkristin dan vinblastin berasal dari bahan alam (Lu *et al.*, 2012). Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) adalah salah satu tanaman yang sangat poten untuk dikembangkan sebagai alternatif terapi kanker. Di masyarakat, bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) sudah banyak dimanfaatkan untuk memperlancar buang air besar, mengurangi nafsu makan, flu, luka bakar dan

sariawan (Direktorat Obat Asli Indonesia, 2010). Bahan aktif yang terkandung diantaranya, flavonoid (gosipetin, hibisetin, sabdaretin) (Hanani, 2015), beta karoten, riboflavin, tiamin (Pramita *et al.*, 2014), saponin dan alkaloid (Gheller *et al.*, 2017) dengan kandungan utama berupa golongan antosianin ialah delphinidin-3-sambubioside dan sianidin-3-sambubioside (Da Costa-Rocha *et al.*, 2014). Penelitian ini akan menelusuri khasiat antikanker dari Fraksi Etanol Bunga Rosella (FEBR), dengan mengetahui aktivitas antioksidan, sitotoksik, dan penghambatan siklus sel dari FEBR terhadap sel kanker kolon WiDr. Metode untuk identifikasi senyawa flavonoid dalam FEBR dilakukan dengan metode KLT. Uji sitotoksik FEBR menggunakan metode *MTT assay* pada sel WiDr kemudian dilanjutkan uji siklus sel menggunakan metode *flowcytometri*. Uji antioksidan FEBR dilakukan dengan metode DPPH (*1-1-difenil-2-pikrilhidrazil*). Uji *in silico* dilakukan dengan menggunakan *molecular docking*, untuk mengetahui afinitas protein target IKK dan VEGF dengan senyawa sianidin 3-sambubioside dari bunga rosella. Penelitian ini diharapkan dapat menjadi acuan masyarakat dan industri obat untuk mengembangkan potensi bunga rosella sebagai antikanker.

## METODE PENELITIAN

### Ekstraksi dan Fraksinasi

Sebanyak 1 kg serbuk simplisia bunga rosella diekstraksi menggunakan 10 L etanol 70% dengan metode maserasi. Ekstrak etanol bunga rosella kemudian difraksinasi fraksinasi metode cair-cair dengan n-hexane menggunakan corong pisah perbandingan 1:1. Kemudian fraksi etanol tersebut dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 60°C dengan kecepatan 100 rpm yang dilanjutkan dengan *waterbath* untuk pengentalan fraksi.

### **Identifikasi Senyawa Metode KLT**

Identifikasi senyawa flavonoid dilakukan dengan menotolkan larutan FEBR pada plat silika gel GF<sub>254</sub>, kemudian dielus dengan fase gerak BAW 4:1:5. Plat silika yang sudah dielus selanjutnya diberi uap amonia dan diamati di bawah lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Diamati warna spot yang tertera dan dihitung nilai Rf.

### **Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH**

Uji aktivitas antioksidan FEBR dilakukan dengan mengambil masing-masing 5 ml dari seri konsentrasi FEBR dan larutan pembanding quersetin, kemudian ditambahkan 1 ml DPPH 0,4 mM dan didiamkan selama *operating time* di ruang tertutup. Absorbansi FEBR dan pembanding quersetin dibaca pada panjang gelombang maksimum DPPH, selanjutnya nilai absorbansi diolah menjadi presentase inhibisi untuk kemudian dilakukan perhitungan IC<sub>50</sub>.

### **Uji Sitotoksik Metode MTT assay**

Sel WiDr dengan kepadatan  $5 \times 10^3$  sel/100  $\mu$ L Media Kultur (MK) didistribusikan ke dalam 96 *well plate* dengan 3 sumuran kosong untuk diisi media kontrol, dan diinkubasi selama 48 jam. Pada akhir inkubasi MK yang mengandung sampel dibuang dan dicuci dengan 50  $\mu$ L PBS. Kemudian pada setiap sumuran ditambahkan 100  $\mu$ L reagen MTT 5mg/ml, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam. Perubahan warna menjadi ungu menandakan bahwa sel tetap hidup karena akibat dari reaksi MTT yang membentuk kristal formazan berwarna ungu. Setelah inkubasi, ditambahkan larutan stopper SDS dalam HCl 0,1% 200  $\mu$ L untuk melarutkan kristal formazan agar tidak mengganggu absorbansi. Kemudian dilakukan pembacaan absorbansi menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm.

### **Uji Siklus Sel Metode Flowsitometri**

Sel WiDr dengan kepadatan  $5 \times 10^5$  sel/sumuran didistribusikan dalam 6 *well plate*

masing-masing sebanyak 1000  $\mu$ L untuk perlakuan dan kontrol sel. Konsentrasi FEBR yang dibuat ialah sesuai dengan IC<sub>50</sub> yang didapatkan pada uji sitotoksik yaitu  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> dan IC<sub>50</sub> dengan volume masing-masing 500  $\mu$ L. Serta konsentrasi Doxorubicin dengan konsentrasi  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> dan IC<sub>50</sub>. Kemudian diinkubasi selama 24 jam. MK diambil dan ditransfer ke konikal. Setelah sel terlepas, ditransfer ke dalam konikal yang berisi MK. Konikal disentrifugasi dengan kecepatan 600 rpm selama 5 menit. MK dibuang, pellet sel dicuci dengan 500  $\mu$ L PBS dingin, disentrifugasi kembali dengan kecepatan dan waktu yang sama. Buang PBS, dan teteskan 500  $\mu$ L alkohol 70% untuk memfiksasi sel. Konikal selanjutnya disimpan pada suhu ruang 37°C selama 30 menit, dan disentrifugasi kembali selama 5 menit. Alkohol dibuang dan kemudian ditambahkan reagen *flowcytometri*. Suspensi sel dimasukkan ke dalam flowsitotube, selanjutnya dilakukan pembacaan profil siklus sel.

### **Molecular Docking**

*Molecular docking* dengan menggunakan *Autodock Vina*, dipastikan semua berkas pada folder yang sama. Pertama, membuat dokumen baru dan diberi nama conf.txt. Kemudian mengisi formulir dengan menuliskan protein 2gng.pdbqt (IKK) dan 2p21.pdbqt (VEGF) ligan dituliskan dengan ligan.pdbqt, sedangkan center\_x,y,z dan size\_x,y,z dituliskan sesuai dengan nilai yang tertera pada grid box, kemudian disimpan pada folder yang sama. Penentuan nilai (RMSD) dilakukan dengan pengisian *Command Prompt Windows*. Ketikkan kode dan tunggu sampai proses selesai dan akan muncul beberapa konformasi yang masing-masing terdapat nilai afinitas RMSD. Konformasi yang dipilih adalah konformasi dengan nilai RMSD kurang dari 2 Å. Kemudian berkas output.pdbqt dipecah menjadi beberapa berkas terpisah sesuai pada masing-masing

konformasi. DS Visualizer untuk visualisasi hasil docking, berkas dengan format .pdbqt diubah dengan menggunakan Open Babel sehingga menjadi .pdb. Visualisasi hasil docking berfungsi untuk mengetahui posisi dan gambaran afinitas antara protein dan ligan secara 3 dimensi.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Ekstraksi dan Fraksinasi

Maserat cair sebanyak 7 L selanjutnya dilakukan fraksinasi cair-cair metode corong pisah menggunakan pelarut n-heksan dengan perbandingan 1:1. FEBR yang didapatkan sebanyak 6,5 L kemudian dievaporasi dengan rotary evaporator. Fraksi kental rosella yang didapatkan sebanyak 366,96 gram dengan presentase rendemen 36,69%.

### Identifikasi Senyawa Metode KLT

**Tabel 1.** Pengamatan Kromatogram

Sinar tampak	Sinar UV 254 nm	Sinar UV 366 nm
		

Pada kromatogram FEBR diduga mengandung senyawa flavonoid pada bercak no 1 dan 2 dengan Rf berturut-turut 0,125 dan 0,537. Berdasar pada warna bercak yang muncul menunjukkan perubahan warna menjadi lebih pekat setelah diuapi amoniak Hal ini mengindikasikan adanya kandungan flavonoid (Trease, 1978) dalam FEBR. Warna lebih pekat diakibatkan oleh reaksi flavonoid dan uap amoniak yang membentuk struktur kinoid

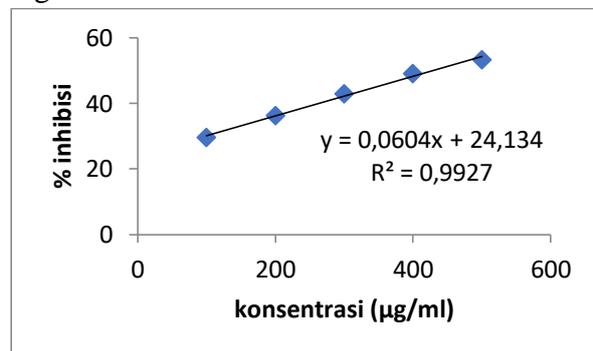
pada cincin B serta ikatan rangkap terkonjugasi menjadi lebih panjang (Robinson, 1995).

### Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

Kemampuan FEBR sebagai antioksidan dapat dilihat dengan menstabilkan radikal bebas DPPH. Pada penelitian ini digunakan seri konsentrasi FEBR sebesar 100, 200, 300, 400, dan 500 µg/mL. Nilai absorbansi setiap konsentrasi kemudian dihitung menjadi presentase inhibisi dengan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Abs Kontrol Negatif} - \text{Abs Sampel}}{\text{Abs Kontrol Negatif}} \times 100\%$$

Kemudian diperoleh grafik hubungan antara presentase inhibisi dengan konsentrasi yang digunakan.



**Gambar 1.** Grafik Inhibisi FEBR

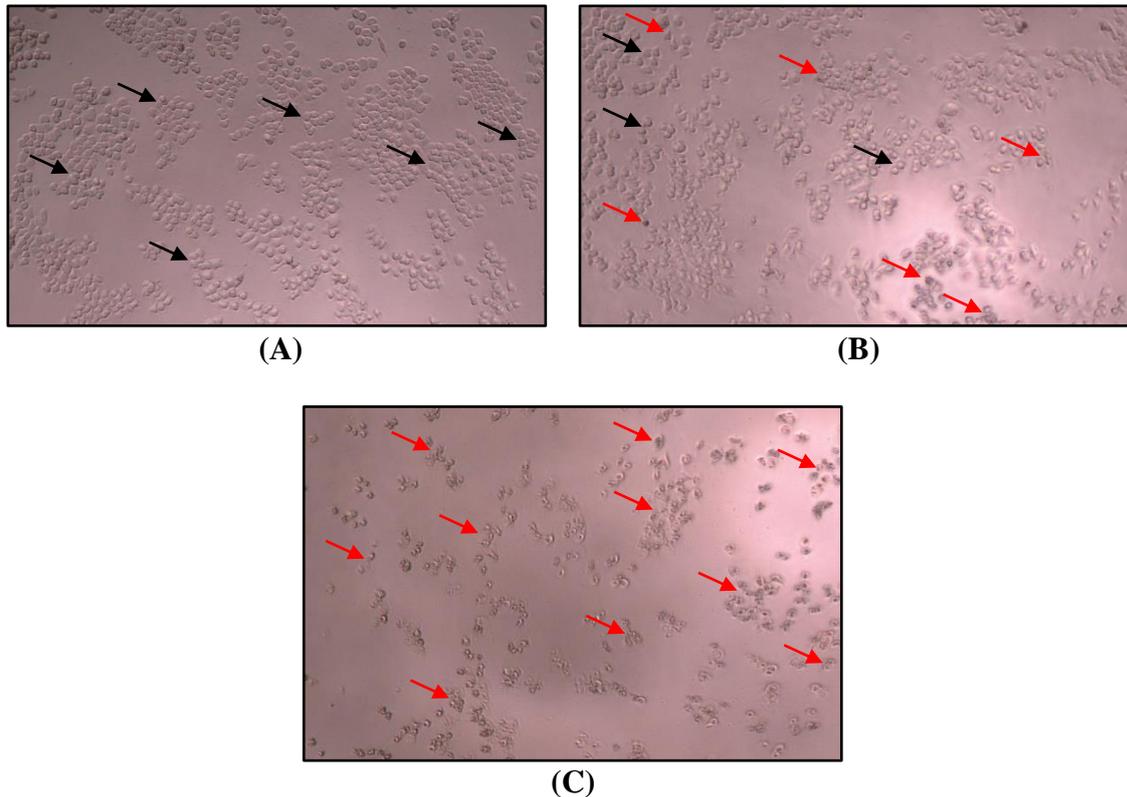
Dari regresi linear yang diperoleh, selanjutnya dilakukan perhitungan  $IC_{50}$ . Hasil nilai  $IC_{50}$  dari FEBR sebesar 428 µg/mL yang termasuk dalam antioksidan lemah.

### Uji Sitotoksik Metode MTT assay

Seri konsentrasi FEBR yang digunakan ialah 1000; 500; 250; 125; 62,5; dan 31,25 µg/mL. Morfologi sel kanker payudara T47D diamati setelah diberikan perlakuan FEBR selama 24 jam (gambar 2). Pengamatan untuk mengetahui gambaran sel dan perubahan morfologi yang terjadi pada sel WiDr dengan menggunakan mikroskop *inverted*. Berdasarkan pengamatan tersebut terjadi perubahan morfologi sel berupa perubahan bentuk yang awalnya cenderung bulat sempurna menjadi bulat tidak beraturan dan mengkerut. FEBR dapat menghambat pertumbuhan sel WiDr terlihat dari perubahan

morfologi yang dihasilkan. Setelah diberi perlakuan FEBR, *doxorubicin* dan reagen MTT selanjutnya diberi reagen *stopper* untuk

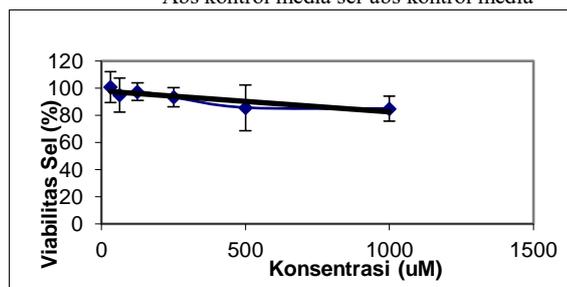
melarutkan kristal formazan yang dihasilkan oleh sel yang hidup, dan kemudian dilakukan perhitungan absorbansi dengan ELISA reader.



**Gambar 2.** Perubahan morfologi sel WiDr (A) Sebelum diberi perlakuan (B) Setelah diberi perlakuan FEBR (C) Setelah diberi perlakuan *doxorubicin*; morfologi sel WiDr yang hidup ditunjukkan dengan panah hitam (↖) dan morfologi sel WiDr yang mati ditunjukkan dengan panah merah (↗)

Absorbansi dihitung sel dengan rumus:

$$\% \text{ Hidup} = \frac{\text{Abs sel dengan perlakuan} - \text{abs kontrol media}}{\text{Abs kontrol media sel} - \text{abs kontrol media}} \times 100\%$$



**Gambar 3.** Grafik Presentase Sel Hidup dengan Perlakuan FEBR

Berdasarkan grafik hubungan antara viabilitas sel dan konsentrasi didapatkan persamaan

regresi linear yang berfungsi untuk menghitung  $IC_{50}$ . Nilai  $IC_{50}$  dari FEBR sebesar  $3217 \mu\text{g/mL}$  sehingga bersifat kurang toksik terhadap sel kanker kolon WiDr.

#### Uji Siklus Sel Metode Flowsitometri

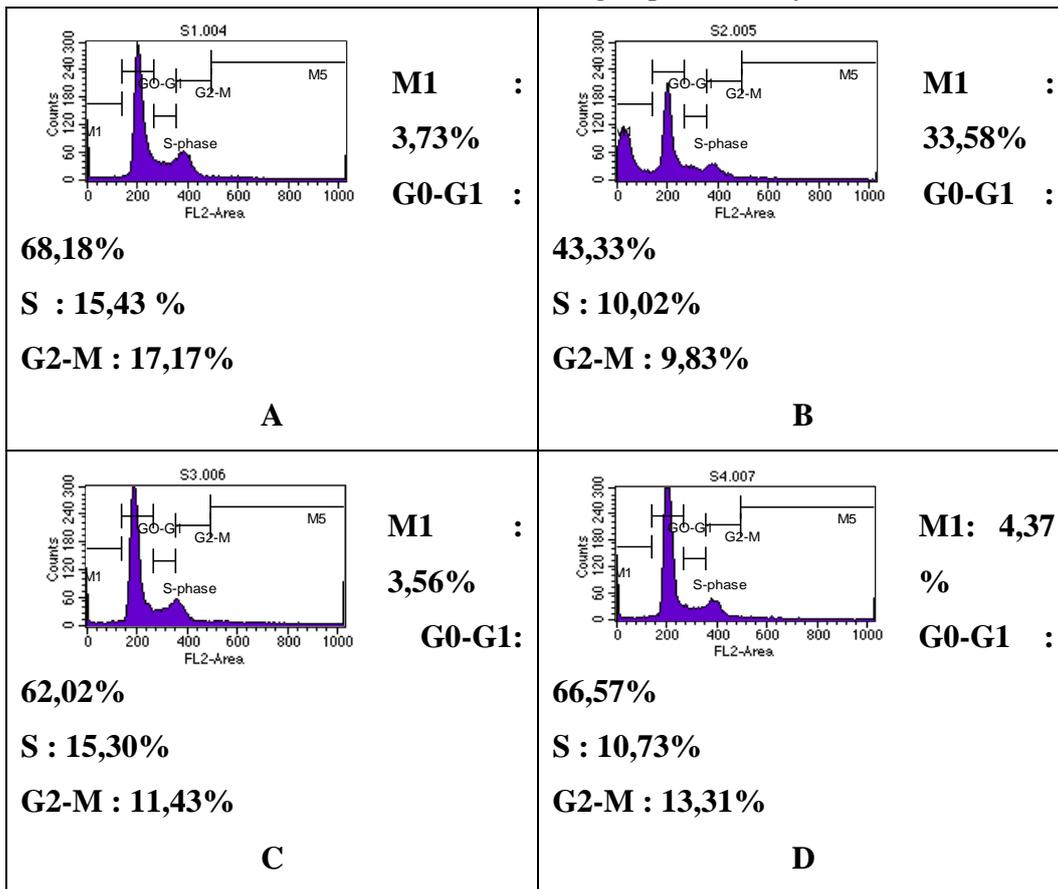
FEBR memiliki kemampuan untuk menghambat sel kanker kolon WiDr berdasarkan uji sitotoksik. Maka untuk mengetahui penghambatan daur sel yang dihambat oleh FEBR digunakan uji siklus sel. Hasil menunjukkan penghambatan siklus sel WiDr yang diberi perlakuan FEBR terjadi pada fase M1 atau *early apoptosis* ditandai

dengan terjadinya peningkatan jumlah sel pada fase tersebut. FEBR menyebabkan peningkatan jumlah sel pada fase M1 jika dibandingkan dengan kontrol sel. Peningkatan dari fase M1 pada kontrol ialah sebesar 3,73% menjadi 4,37% pada perlakuan IC<sub>50</sub> (gambar 4).

**Molecular Docking**

*Molecular docking* dilakukan dengan menggunakan aplikasi *Autodock Vina* dan *Open babel* kemudian divisualisasikan bentuk

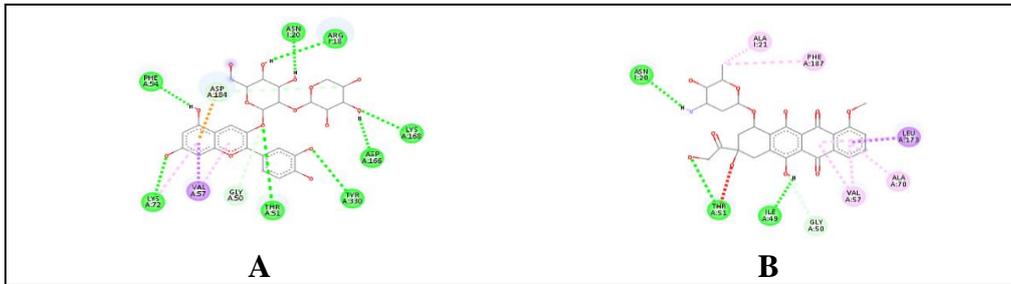
strukturnya secara 2 dimensi dan 3 dimensi dengan aplikasi *DS Visualizer*. Docking score sianidin-3-sambubioside dari bunga rosella dan doxorubicin terhadap protein IKK menunjukkan nilai berturut-turut -9,6 dan -8,7. Sedangkan terhadap protein VEGF menunjukkan nilai -6,7 dan -7,3. Dari uji yang telah dilakukan, seluruh reseptor memiliki nilai RMSD < 2 Å, yang menunjukkan posisi ligan hasil docking memiliki kemiripan dengan posisi aslinya.



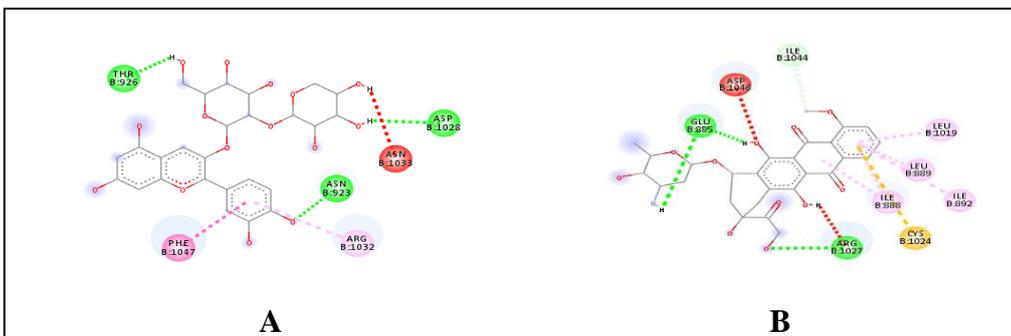
**Gambar 4.** Profil Siklus Sel WiDr (A) kontrol sel, (B) dengan perlakuan *doxorubicin*, (C) dengan perlakuan FEBR ½IC<sub>50</sub>, (D) perlakuan FEBR IC<sub>50</sub>

Nilai dari afinitas setiap ikatan berdasarkan *docking score* menunjukkan nilai yang negatif, hal ini menunjukkan bahwa reaksi yang terjadi antara ligan dengan reseptor hanya membutuhkan energi yang sedikit untuk berikatan kuat. Berdasarkan hasil studi ini, dapat diketahui bahwa sianidin 3-

sambubioside dari bunga rosella berikatan dengan protein IKK dengan stabil dan lebih baik dibandingkan dengan protein VEGF. Visualisasi interaksi sianidin 3-sambubioside dan *doxorubicin* pada protein target secara 2 dimensi ditunjukkan pada gambar 5 dan 6.



**Gambar 5.** Visualisasi 2D pada Protein IKK (A) Sianidin 3-sambubioside (B) *Doxorubicin*



**Gambar 6.** Visualisasi 2D pada Protein VEGF (A) Sianidin 3-sambubioside (B) *Doxorubicin*

## KESIMPULAN

Senyawa flavonoid dalam FEBR ditunjukkan dengan bercak ungu tua dan ungu muda pada UV 366. Kemampuan antioksidan FEBR lemah dengan nilai  $IC_{50}$  428  $\mu\text{g/mL}$ . Uji sitotoksik pada sel kanker kolon WiDr menghasilkan nilai  $IC_{50}$  sebesar 3127  $\mu\text{g/mL}$  yang tergolong lemah. Hasil menunjukkan penghambatan siklus sel pada masing-masing sel terjadi pada fase M1. Uji *in silico* dengan protein target IKK, dan VEGF nilai *docking score* yang diperoleh antara sianidin 3-sambubioside dengan protein IKK dan VEGF sebesar -9.6 kcal/mol dan -6.7 kcal/mol.

## DAFTAR PUSTAKA

Abdullah, M., Sudoyo, A. W., Utomo, A. R., Fauzi, A., & Rani, A. A. (2012). Molecular profile of colorectal cancer in Indonesia: Is there another pathway? *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 5(2), 71–78.

Arifianti L., Sukadirman, Studiawan H., Rakhmawati and Megawati L., 2014, Ekstrak biji Sirsak (*Annoma muricata* L.)

Terhadap Sel Kanker Mamalia Secara Invitro, *Jurnal Farmasi dan Ilmu Kesehatan Indonesia*, 1 (2)

Bardhan, K., & Liu, K. (2013). Epigenetics and colorectal cancer pathogenesis. *Cancers*, 5(2), 676–713.

Da-Costa-Rocha, I, Bonnlaender, B, Sievers, H, Pischel, I, Heinrich, M. 2014. Hibiscus sabdariffa L. – a phytochemical and pharmacological review. *Food Chemistry*. 165:424-443

Direktorat Obat Asli Indonesia, 2010, *Serial Data Ilmiah Terkini Tumbuhan Obat Hibiscus Sabdariffa L.*, Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan RI.

Gheller, A. C. G. V., Kerkhoff, J., Vieira Júnior, G. M., Campos, K. E. de, & Sugui, M. M. (2017). Antimutagenic Effect of *Hibiscus sabdariffa* L. Aqueous Extract on Rats Treated with Monosodium Glutamate. *The Scientific World Journal*, 2017, 1–8.

Hanani, Endang., 2015, *Analisis Fitokimia*, Jakarta: EGC.

International Agency for Research on Cancer (IARC) / WHO. (2012). GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality, and prevalence world wide in 2012.

Pramita, dkk. 2014, *Pengaruh Ekstrak kelopak Rosella (Hibiscus sabdariffa L.) Pada Aktivitas SOD dan MDA Mata Tikus (Rattus Wistar) yang Dipapar Radiasi Gamma*, Natural, 2. 4

Robinson, T., 1995, *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*, edisi keenam, Departement of Biochemistry University of Massachussetts, diterjemahkan oleh Kosasih, P., Penerbit ITB, Bandung. Hal : 157, 161, 198

Trease, G.E and Evans, W. C, 1978, *Farmacognosy 19<sup>th</sup>*, Edition II, Baillera Tindall, London