

AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL DAUN AKASIA MANGIUM TERHADAPSEL KANKER SERVIKS HeLa SECARA *IN VITRO*

Vera Astuti ^{1*}, Sonlimar Mangunsong ², Lilis Maryanti ³

¹Jurusan Farmasi, Poltekkes Kemenkes Palembang, email: vera@poltekkespalembang.ac.id

²Jurusan Farmasi, Poltekkes Kemenkes Palembang, email: sonlimar@poltekkespalembang.ac.id

³Jurusan Farmasi, Poltekkes Kemenkes Palembang, email: lilismaryanti@poltekkespalembang.ac.id

*Corresponding author email: vera@poltekkespalembang.ac.id

ABSTRAK

Tingginya angka kematian yang ditimbulkan menjadikan kanker serviks sebagai salah satu masalah kesehatan utama pada perempuan di berbagai belahan dunia. Eksplorasi bahan alam sebagai sumber kandidat antikanker terus dikembangkan untuk memperoleh senyawa yang lebih efektif dan aman. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas sitotoksik ekstrak etanol daun akasia mangium terhadap sel kanker serviks HeLa serta menentukan nilai *Inhibitory Concentration* 50% (IC_{50}). Daun akasia diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol 97%, kemudian ekstrak diuji terhadap sel HeLa pada rentang konsentrasi 7,8125–2000 ppm menggunakan metode *MTT assay*. Aktivitas sitotoksik ditentukan berdasarkan nilai absorbansi pada panjang gelombang 550 nm menggunakan *microplate reader*, yang selanjutnya digunakan untuk menghitung persentase viabilitas dan kematian sel. Penentuan nilai IC_{50} dilakukan melalui analisis regresi linear probit antara log konsentrasi ekstrak dan respons kematian sel. Hasil penelitian menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak diikuti oleh peningkatan persentase kematian sel HeLa secara *dose-dependent*. Analisis probit menghasilkan persamaan regresi $y=1,5199x+1,1980$ dengan koefisien determinasi $R^2=0,8060$, serta nilai IC_{50} sebesar 317,33 ppm. Berdasarkan nilai tersebut, ekstrak etanol daun akasia mangium tergolong memiliki aktivitas sitotoksik lemah terhadap sel HeLa. Meskipun demikian, hasil ini menunjukkan bahwa daun akasia berpotensi sebagai sumber senyawa bioaktif antikanker berbasis bahan alam dan masih memerlukan penelitian lanjutan melalui fraksinasi, isolasi senyawa aktif, serta kajian mekanisme molekuler.

Kata Kunci: Akasia mangium, *MTT assay*, sitotoksitas, IC_{50} , antikanker, HeLa

PENDAHULUAN

Kanker masih menjadi salah satu penyebab utama morbiditas dan mortalitas di dunia serta merupakan tantangan besar dalam bidang kesehatan global. Menurut laporan *Global Cancer Observatory* dan World Health Organization, kanker menyebabkan jutaan kasus baru dan kematian setiap tahun, dengan peningkatan beban penyakit yang dipengaruhi oleh pertumbuhan populasi, penuaan, perubahan gaya hidup, paparan faktor lingkungan, serta faktor genetik (Sung et al., 2021; World Health Organization, 2024). Di antara berbagai jenis kanker pada perempuan, kanker serviks masih menjadi salah satu

masalah kesehatan utama, terutama di negara berkembang, akibat tingginya angka kejadian dan keterbatasan akses terhadap deteksi serta pengobatan dini (World Health Organization, 2024). Berbagai pendekatan terapi, seperti pembedahan, radioterapi, kemoterapi, terapi target, dan imunoterapi, telah dikembangkan dalam penatalaksanaan kanker. Namun, efektivitas terapi masih menghadapi berbagai kendala, termasuk resistensi obat, toksisitas terhadap sel normal, efek samping sistemik, serta biaya pengobatan yang tinggi, sehingga pencarian agen antikanker baru yang lebih efektif dan aman masih terus dilakukan (National Cancer Institute, 2023; Sung et al., 2021).

Eksplorasi bahan alam sebagai sumber senyawa antikanker merupakan salah satu pendekatan yang terus berkembang dalam penemuan obat modern. Produk alam memiliki kontribusi penting dalam pengembangan agen terapeutik karena menyediakan keragaman struktur kimia dan aktivitas biologis yang luas. Berbagai senyawa bioaktif dari tumbuhan telah dikembangkan sebagai kandidat obat maupun sebagai senyawa utama dalam desain obat baru, termasuk agen antikanker (Atanasov et al., 2021). Metabolit sekunder tumbuhan, seperti flavonoid, senyawa fenolik, alkaloid, saponin, dan tanin, diketahui memiliki berbagai aktivitas biologis yang berpotensi mendukung pengembangan terapi kanker. Oleh karena itu, eksplorasi tanaman yang kaya akan metabolit sekunder bioaktif menjadi strategi penting dalam pencarian kandidat antikanker berbasis bahan alam.

Salah satu tanaman yang berpotensi untuk dieksplorasi adalah akasia mangium. Tanaman ini banyak tumbuh dan dibudidayakan di wilayah tropis serta memiliki berbagai pemanfaatan, termasuk dalam bidang kehutanan dan pengobatan tradisional. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa akasia mangium mengandung berbagai metabolit sekunder, terutama senyawa fenolik, flavonoid, dan tanin terkondensasi yang berperan terhadap aktivitas biologisnya. Kandungan polifenol pada tanaman *Acacia* diketahui memiliki aktivitas antioksidan dan farmakologis yang berkaitan dengan keberadaan gugus fenolik dalam strukturnya (Tungmunthum et al., 2018; Kopustinskiene et al., 2020). Selain itu, senyawa flavonoid dan fenolik dari berbagai tanaman dilaporkan memiliki aktivitas antiproliferasi melalui mekanisme seperti induksi apoptosis, penghentian siklus sel, modulasi stres oksidatif, serta regulasi jalur pensinyalan yang berperan dalam perkembangan kanker (Kopustinskiene et al., 2020; Tungmunthum et al., 2018). Flavonoid juga diketahui mampu meningkatkan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) pada sel kanker, menyebabkan gangguan fungsi mitokondria, dan mengaktifasi jalur kematian sel terprogram sehingga dapat menghambat pertumbuhan sel

tumor (Kopustinskiene et al., 2020). Berdasarkan kandungan metabolit sekundernya, akasia mangium memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai sumber senyawa bioaktif antikanker.

Evaluasi awal terhadap potensi antikanker bahan alam umumnya dilakukan melalui pengujian sitotoksitas secara *in vitro* menggunakan kultur sel kanker. Salah satu metode yang banyak digunakan adalah *MTT assay*, yaitu metode kolorimetri yang mengukur viabilitas sel berdasarkan kemampuan enzim mitokondria pada sel hidup dalam mereduksi garam tetrazolium menjadi kristal formazan berwarna ungu. Intensitas warna yang dihasilkan berkorelasi dengan jumlah sel hidup sehingga dapat digunakan untuk menentukan efek sitotoksik suatu ekstrak atau senyawa terhadap sel kanker (Riss et al., 2016; Ghasemi et al., 2021). Metode ini memiliki keunggulan berupa sensitivitas yang baik, prosedur yang relatif sederhana, serta banyak digunakan dalam skrining awal kandidat antikanker dari bahan alam. Sel HeLa dipilih sebagai model uji karena merupakan lini sel kanker serviks yang luas digunakan dalam penelitian sitotoksitas dan skrining antikanker *in vitro*, dengan karakter pertumbuhan yang stabil dan respons yang baik terhadap evaluasi senyawa bioaktif (Liu et al., 2023; Yanti et al., 2024).

Meskipun aktivitas biologis dari berbagai spesies dalam genus *Acacia* telah banyak dilaporkan, informasi mengenai aktivitas sitotoksik ekstrak etanol daun akasia mangium terhadap sel kanker serviks HeLa masih terbatas. Penelitian yang secara spesifik mengevaluasi potensi sitotoksik ekstrak etanol daun akasia mangium pada model sel HeLa masih belum banyak ditemukan. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi aktivitas sitotoksik ekstrak etanol daun akasia mangium terhadap sel kanker serviks HeLa menggunakan metode *MTT assay* serta menentukan nilai *Inhibitory Concentration 50%* (IC₅₀) sebagai parameter potensi antikanker. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai potensi daun akasia mangium sebagai sumber kandidat agen antikanker

berbasis bahan alam serta menjadi dasar bagi penelitian lanjutan terkait isolasi senyawa aktif, pengujian selektivitas terhadap sel normal, dan kajian mekanisme molekuler aktivitas antikankernya.

METODE PENELITIAN

Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium secara *in vitro* untuk mengevaluasi aktivitas sitotoksik ekstrak etanol daun akasia mangium terhadap sel kanker serviks HeLa menggunakan metode *MTT assay*. Tahapan penelitian meliputi ekstraksi bahan tanaman, skrining fitokimia, pengujian sitotoksitas pada sel HeLa, dan analisis data untuk menentukan nilai *Inhibitory Concentration* 50% (IC_{50}) sebagai parameter potensi sitotoksik ekstrak (Freshney, 2021).

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat preparasi simplisia dan ekstraksi, yaitu nampan pengering, blender listrik, botol maserasi, corong kaca, kertas saring, *vacuum rotary evaporator*, dan desikator, serta peralatan kultur sel dan uji sitotoksitas berupa autoklaf, *laminar air flow* (LAF), inkubator CO₂, sentrifus, mikroskop inverted, *cell counter*, *microplate reader*, dan mikroplate 96 sumur. Bahan yang digunakan meliputi daun akasia mangium, etanol 97%, dan akuades untuk proses ekstraksi, serta sel kanker serviks HeLa, medium Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), *fetal bovine serum* (FBS) 10%, penisilin-streptomisin 3%, fungison 1%, natrium bikarbonat (NaHCO₃), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), dimetil sulfoksida (DMSO), reagen 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida (MTT), dan larutan *sodium dodecyl sulfate* (SDS) 10% untuk pengujian sitotoksitas. Pengujian *MTT assay* dilaksanakan di Laboratorium Riset Terpadu Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat, dan Keperawatan Universitas Gadjah Mada.

Prosedur Penelitian

Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Akasia Mangium

Sampel daun akasia mangium diperoleh dari daerah Indralaya Utara, Kabupaten Ogan Ilir, Sumatera Selatan. Identifikasi awal bahan tanaman dilakukan berdasarkan karakter morfologi daun dan nama lokal tanaman sebagai akasia mangium, namun penelitian ini belum dilengkapi dengan determinasi botani formal. Daun dipisahkan dari tangkai, dicuci, dikeringanginkan pada suhu ruang di tempat terlindung dari sinar matahari langsung, kemudian dihaluskan menjadi serbuk simplisia. Sebanyak 2.000 g serbuk simplisia diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol 97% selama 3 × 24 jam disertai pengadukan berkala. Filtrat hasil maserasi disaring dan diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 40–45°C hingga diperoleh ekstrak kental, kemudian disimpan dalam desikator berisi silika gel sampai digunakan untuk pengujian sitotoksitas. Metode maserasi dipilih karena sederhana dan sesuai untuk mengekstraksi senyawa bioaktif yang relatif termolabil, sedangkan etanol digunakan sebagai pelarut karena mampu mengekstraksi berbagai metabolit sekunder, termasuk senyawa fenolik, flavonoid, dan tanin (Zhang et al., 2018; Abubakar & Haque, 2020; Ameer et al., 2023).

Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan terhadap ekstrak etanol daun akasia mangium untuk mengidentifikasi keberadaan golongan metabolit sekunder secara kualitatif. Uji alkaloid dilakukan menggunakan pereaksi Mayer dan Dragendorff, uji flavonoid menggunakan metode Shinoda, uji saponin dengan pembentukan busa, uji tanin dan fenolik menggunakan larutan FeCl₃ 1%, serta uji terpenoid dan steroid menggunakan pereaksi Liebermann–Burchard. Terbentuknya perubahan warna, busa stabil, atau endapan tertentu digunakan sebagai indikator positif adanya golongan senyawa yang diuji (Shaikh & Patil, 2020).

Kultur Sel HeLa

Sel kanker serviks HeLa diperoleh dari Laboratorium Riset Terpadu Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat, dan Keperawatan Universitas Gadjah Mada. Sel dipelihara dalam medium DMEM yang diperkaya dengan 10% FBS, 3% penisilin-streptomisin, 1% fungison, NaHCO_3 , dan HEPES. Kultur sel diinkubasi pada suhu 37°C dalam atmosfer 5% CO_2 hingga mencapai tingkat konfluensi yang sesuai. Selanjutnya, sel dipanen dan dihitung menggunakan cell counter sebelum digunakan dalam pengujian aktivitas sitotoksik.

Uji Sitotoksitas dengan Metode *MTT* Assay

Suspensi sel HeLa didistribusikan ke dalam mikrolate 96 sumur dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam atmosfer 5% CO_2 untuk memungkinkan perlekatan sel. Selanjutnya, sel diberi perlakuan ekstrak etanol daun akasia mangium pada konsentrasi 7,8125; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000; dan 2000 ppm, masing-masing dalam lima kali pengulangan. Doksorubisin digunakan sebagai kontrol positif, sedangkan kontrol media dan kontrol sel digunakan sebagai pembanding.

Setelah perlakuan selama 24 jam, medium kultur diaspirasi, kemudian ke setiap sumur ditambahkan 100 μL DMEM segar dan 10 μL larutan MTT (5 mg/mL), lalu diinkubasi selama 4–6 jam. Selanjutnya ditambahkan 100 μL larutan SDS 10% dalam HCl 0,01 N untuk melarutkan kristal formazan, kemudian mikrolate diinkubasi selama 12 jam pada suhu kamar dalam kondisi terlindung dari cahaya. Nilai absorbansi diukur menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 550 nm (Kamiloglu et al., 2020; Ghasemi et al., 2021).

Analisis Data

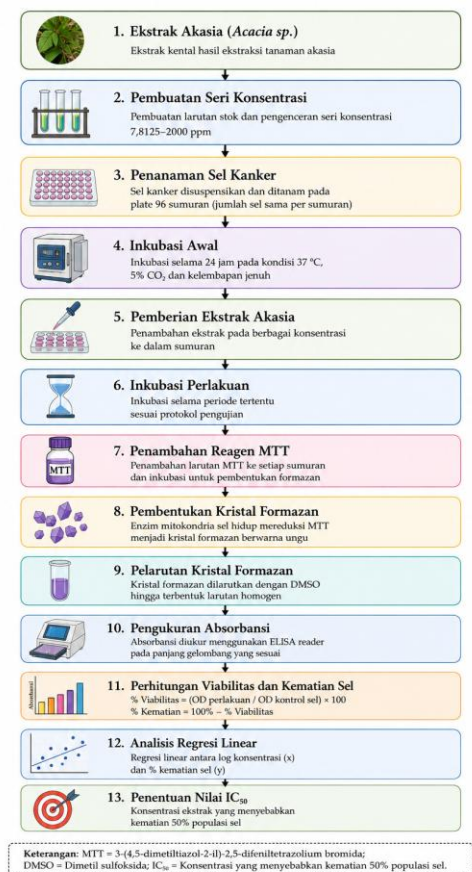
Data absorbansi hasil *MTT assay* digunakan untuk menghitung persentase viabilitas dan persentase kematian sel pada setiap konsentrasi ekstrak. Persentase kematian sel kemudian ditransformasikan ke nilai probit dan dianalisis dengan regresi linear

terhadap logaritma konsentrasi ekstrak. Nilai *Inhibitory Concentration* 50% (IC_{50}) ditentukan dari persamaan regresi dengan menetapkan nilai probit 5, yang ekuivalen dengan 50% kematian sel. Pada analisis probit, data persentase kematian sel $\leq 0\%$ atau $\geq 100\%$ terlebih dahulu disesuaikan menjadi 0,01% dan 99,99% agar dapat ditransformasikan ke dalam nilai probit.

Analisis Statistik

Data absorbansi hasil *MTT assay* digunakan untuk menghitung persentase viabilitas dan kematian sel, kemudian disajikan sebagai rerata $\pm$ simpangan baku. Perbedaan viabilitas sel antar kelompok konsentrasi dianalisis menggunakan *One-Way ANOVA* pada tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Penentuan nilai *Inhibitory Concentration* 50% (IC_{50}) dilakukan dengan analisis regresi probit antara persentase kematian sel yang telah ditransformasikan ke nilai probit dan log konsentrasi ekstrak. Nilai IC_{50} diperoleh dari persamaan regresi pada probit 5, yang ekuivalen dengan 50% kematian sel. Hubungan konsentrasi ekstrak dan respons sitotoksik divisualisasikan dalam kurva dosis–respons. Prinsip pengukuran viabilitas sel dengan *MTT assay* serta interpretasi respons sitotoksik mengacu pada metode uji viabilitas sel yang umum digunakan pada pengujian *in vitro* (Riss et al., 2016; Ghasemi et al., 2021).

Untuk mempermudah pemahaman terhadap tahapan penelitian yang dilakukan, mulai dari preparasi sampel hingga penentuan nilai IC_{50} , alur penelitian disajikan dalam bentuk skema pada Gambar 1.

Gambar 1. Skema alur penelitian *MTT assay*

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Ekstraksi Daun Akasia Mangium

Ekstrak etanol daun akasia mangium diperoleh melalui metode maserasi menggunakan etanol 97%. Dari 2.000 g simplisia kering dihasilkan 208,6 g ekstrak kental dengan rendemen sebesar 10,43%. Karakteristik ekstrak yang diperoleh disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik dan Rendemen Ekstrak Etanol Daun Akasia Mangium

Parameter	Hasil
Berat simplisia (g)	2.000
Metode ekstraksi	Maserasi
Pelarut	Etanol 97%
Berat ekstrak kental (g)	208,6
Rendemen (%)	10,43
Bentuk	Kental
Warna	Hijau kecokelatan
Bau	Khas aromatik

Nilai rendemen 10,43% menunjukkan bahwa proses maserasi dengan etanol 97% mampu mengekstraksi komponen terlarut dari daun akasia mangium dalam jumlah yang cukup. Etanol merupakan pelarut yang luas digunakan pada ekstraksi bahan alam karena mampu melarutkan berbagai metabolit sekunder, terutama senyawa polar hingga semipolar seperti fenolik, flavonoid, tanin, saponin, dan alkaloid. Selain jenis pelarut, besarnya rendemen ekstrak juga dipengaruhi oleh karakteristik bahan tanaman, ukuran partikel simplisia, rasio bahan–pelarut, lama kontak, suhu, dan metode ekstraksi yang digunakan. Dengan demikian, rendemen yang diperoleh pada penelitian ini mencerminkan hasil ekstraksi total komponen terlarut dari simplisia daun akasia mangium, meskipun tidak secara langsung menunjukkan kadar senyawa aktif tertentu di dalam ekstrak (Abubakar & Haque, 2020; Ameer et al., 2023; Selvamuthukumaran & Shi, 2024).

Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Akasia Mangium

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi golongan metabolit sekunder yang diduga berkontribusi terhadap aktivitas biologis ekstrak. Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun akasia mangium mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, fenolik, dan terpenoid, sedangkan steroid tidak terdeteksi (Tabel 2).

Tabel 2. Profil Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Akasia Mangium

Golongan Senyawa	Pereaksi	Hasil
Alkaloid	Mayer, Dragendorff	+
Flavonoid	Mg-HCl (Shinoda)	+
Terpenoid	Liebermann-Burchard	+
Steroid	Liebermann-Burchard	–
Tanin	FeCl ₃ 1%	+
Fenolik	FeCl ₃ 1%	+
Saponin	Uji Busa	+

Keterangan: (+) terdeteksi; (–) tidak terdeteksi.

Keberadaan flavonoid, tanin, dan senyawa fenolik pada ekstrak ini sejalan dengan laporan

bahwa spesies *Acacia*, termasuk *Acacia mangium*, mengandung berbagai senyawa bioaktif seperti polifenol, flavonoid, dan tanin yang berpotensi berkontribusi terhadap aktivitas biologisnya (Sharma et al., 2023; Maugeri et al., 2022; Al-Rimawi et al., 2021). Flavonoid diketahui mampu menginduksi apoptosis, menghambat proliferasi sel, serta menyebabkan penghentian siklus sel. Sementara itu, senyawa fenolik dan tanin dapat meningkatkan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) yang memicu kerusakan sel kanker dan aktivasi jalur apoptosis (Kopustinskiene et al., 2020; Albuquerque et al., 2021; Wendlocha et al., 2024). Dengan demikian, aktivitas sitotoksik ekstrak etanol daun akasia mangium terhadap sel HeLa kemungkinan merupakan hasil kontribusi beberapa metabolit sekunder yang bekerja secara sinergis, meskipun identifikasi senyawa aktif spesifik masih memerlukan kajian lanjutan melalui fraksinasi dan isolasi.

Karakteristik Data Absorbansi

Aktivitas sitotoksik ekstrak etanol daun akasia mangium terhadap sel HeLa dievaluasi menggunakan metode *MTT assay*, di mana nilai absorbansi mencerminkan jumlah sel hidup yang masih mampu mereduksi MTT menjadi kristal formazan. Nilai absorbansi kelompok kontrol digunakan sebagai acuan dalam perhitungan viabilitas dan kematian sel, sedangkan hasil pengukuran disajikan sebagai rerata $\pm$ simpangan baku dari lima kali pengulangan. Data absorbansi kelompok kontrol disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Data Absorbansi Kelompok Kontrol

Kelompok	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
Kontrol Media (KM)	–	0,0443 $\pm$ 0,002
Kontrol Sel (KS)	–	0,4463 $\pm$ 0,006
Kontrol Pelarut (KP)	–	0,0400 $\pm$ 0,002
	100	0,1180 $\pm$ 0,001
Doxorubicin (Kontrol Positif)	50	0,2113 $\pm$ 0,014
	25	0,2713 $\pm$ 0,001
	12,5	0,3090 $\pm$ 0,005

Kelompok	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
	6,25	0,3290 $\pm$ 0,016

Keterangan: data disajikan sebagai rerata $\pm$ SD dari lima kali pengulangan.

Nilai absorbansi kontrol sel (0,4463 $\pm$ 0,006) yang lebih tinggi dibandingkan kontrol media (0,0443 $\pm$ 0,002) menunjukkan bahwa sel HeLa berada dalam kondisi viabel selama pengujian. Sementara itu, nilai absorbansi kontrol pelarut (0,040 $\pm$ 0,002) yang mendekati kontrol media menunjukkan bahwa pelarut tidak memberikan pengaruh bermakna terhadap pembacaan absorbansi. Dengan demikian, perubahan absorbansi pada kelompok perlakuan dapat digunakan untuk mengevaluasi respons sitotoksik ekstrak terhadap sel HeLa (Riss et al., 2016; Ghasemi et al., 2021).

Persentase Kematian dan Viabilitas Sel HeLa

Aktivitas sitotoksik ekstrak etanol daun akasia mangium terhadap sel HeLa dievaluasi menggunakan metode *MTT assay*. Nilai absorbansi hasil pengukuran digunakan untuk menghitung persentase kematian dan viabilitas sel, kemudian disajikan sebagai rerata $\pm$ simpangan baku dari lima kali pengulangan. Nilai absorbansi sel HeLa pada berbagai konsentrasi ekstrak disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Nilai Absorbansi Ekstrak Etanol Daun Akasia Mangium terhadap Sel HeLa

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
7,8125	0,456 $\pm$ 0,011
15,625	0,422 $\pm$ 0,006
31,25	0,407 $\pm$ 0,007
62,5	0,329 $\pm$ 0,007
125	0,251 $\pm$ 0,009
250	0,219 $\pm$ 0,005
500	0,194 $\pm$ 0,007
1000	0,163 $\pm$ 0,008
2000	0,156 $\pm$ 0,011

Keterangan: data disajikan sebagai rerata $\pm$ SD dari lima kali pengulangan.

Peningkatan konsentrasi ekstrak menyebabkan penurunan absorbansi secara bertahap, yang menunjukkan berkurangnya jumlah sel hidup akibat efek sitotoksik ekstrak. Persentase kematian sel hasil perhitungan disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Persentase Kematian Sel Hela setelah Perlakuan Ekstrak Etanol Daun Akasia Mangium dan Doxorubicin

Kelompok	Konsentrasi (ppm)	% Kematian Sel
Ekstrak etanol daun akasia mangium	2000	64,71 ± 2,38
	1000	63,05 ± 1,70
	500	56,03 ± 1,59
	250	50,45 ± 1,04
	125	43,21 ± 2,07
	62,5	25,64 ± 1,64
	31,25	7,99 ± 1,67
	15,625	4,45 ± 1,25
	7,8125	-3,17 ± 2,61
Doxorubicin	100	103,31 ± 0,424
	50	86,41 ± 2,553
	25	75,64 ± 1,559
	12,5	69,54 ± 0,928
	6,25	69,17 ± 0,965

Keterangan: dilakukan pengulangan sebanyak lima kali; data dalam bentuk rata-rata±SD.

Selain itu, viabilitas sel HeLa setelah perlakuan ekstrak dan doxorubicin disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Persentase Viabilitas Sel Hela setelah Perlakuan Ekstrak Etanol Daun Akasia Mangium dan Doxorubicin

Kelompok	Konsentrasi (ppm)	Viabilitas Sel (%)
Ekstrak etanol daun akasia mangium	7,8125	103,17 ± 2,61
	15,625	95,55 ± 1,25
	31,25	92,01 ± 1,67
	62,5	74,36 ± 1,64
	125	56,79 ± 2,07
	250	49,55 ± 1,04
	500	43,97 ± 1,59
	1000	36,95 ± 1,70
	2000	35,29 ± 2,38

Kelompok	Konsentrasi (ppm)	Viabilitas Sel (%)
Doxorubicin	6,25	30,83 ± 0,965
	12,5	30,46 ± 0,928
	25	24,36 ± 1,559
	50	13,59 ± 2,553
	100	-3,309 ± 0,424

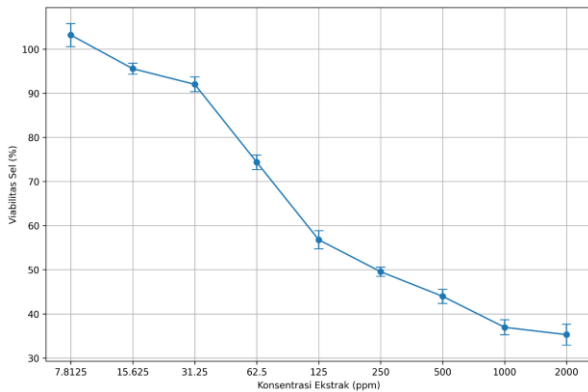
Keterangan: dilakukan pengulangan sebanyak lima kali; data dalam bentuk rata-rata±SD.

Data menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak diikuti oleh peningkatan persentase kematian sel dan penurunan viabilitas sel HeLa. Persentase kematian sel meningkat dari -3,17% pada konsentrasi 7,8125 ppm menjadi 64,71% pada konsentrasi 2000 ppm, sedangkan viabilitas sel menurun dari 103,17% menjadi 35,29%. Nilai kematian sel negatif pada konsentrasi 7,8125 ppm menunjukkan bahwa viabilitas sel pada kelompok tersebut sedikit lebih tinggi dibandingkan kontrol sel, sehingga secara praktis diinterpretasikan sebagai tidak adanya efek sitotoksik pada konsentrasi tersebut. Pola ini menunjukkan hubungan dosis-respons, di mana peningkatan konsentrasi ekstrak diikuti oleh peningkatan efek sitotoksik terhadap sel HeLa.

Pada konsentrasi 250 ppm, persentase kematian sel telah mencapai 50,45%, yang menunjukkan bahwa kisaran konsentrasi tersebut berada di sekitar titik hambat 50% sel. Sementara itu, doxorubicin sebagai kontrol positif menunjukkan efek sitotoksik yang jauh lebih kuat pada konsentrasi yang lebih rendah. Simpangan baku yang relatif kecil pada seluruh kelompok perlakuan menunjukkan bahwa variasi antarulangan rendah dan hasil pengujian memiliki reproduksibilitas yang baik. Secara keseluruhan, data ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun akasia mangium memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa yang meningkat seiring kenaikan konsentrasi perlakuan (Riss et al., 2016; Ghasemi et al., 2021; Gavanji et al., 2023).

Untuk memperjelas hubungan antara konsentrasi ekstrak dan respons sel, data viabilitas divisualisasikan dalam bentuk kurva

dosis–respons pada Gambar 2. Kurva tersebut menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak diikuti oleh penurunan viabilitas sel HeLa secara bertahap, yang mengonfirmasi pola sitotoksik yang bersifat *dose-dependent*.



Gambar 2. Kurva dosis–respons ekstrak etanol daun akasia mangium terhadap viabilitas sel HeLa

Penentuan Nilai IC₅₀

Nilai *Inhibitory Concentration 50%* (IC₅₀) ekstrak etanol daun akasia mangium dan doxorubicin terhadap sel HeLa ditentukan menggunakan analisis regresi linear probit, yaitu dengan memplot log konsentrasi sebagai variabel bebas dan nilai probit persentase kematian sel sebagai variabel terikat. Transformasi probit digunakan untuk memperoleh hubungan yang lebih linear antara peningkatan konsentrasi dan respons sitotoksik, sehingga memudahkan penentuan konsentrasi yang menyebabkan 50% kematian sel. Pada analisis ini, nilai persentase kematian sel 0% dan $\geq 100\%$ terlebih dahulu disesuaikan menjadi 0,01% dan 99,99% agar dapat ditransformasikan ke dalam nilai probit (Finney, 1971; EPA, 1991). Hasil transformasi data disajikan pada Tabel 7.

Tabel 7. Transformasi Data Persentase Kematian Sel untuk Analisis Regresi Probit Ekstrak Etanol Daun Akasia Mangium dan Doxorubicin terhadap Sel HeLa

Kelompok	Konsentrasi (ppm)	Log konsentrasi	Kematian sel (%)	Probit
Ekstrak etanol daun	7,8125	0,893	0,01*	1,281
	15,625	1,194	5,96	3,442
	31,25	1,495	9,86	3,710

Kelompok	Konsentrasi (ppm)	Log konsentrasi	Kematian sel (%)	Probit
akasia mangium	62,5	1,796	29,26	4,454
	125	2,097	48,59	4,965
	250	2,398	56,55	5,165
	500	2,699	62,68	5,323
	1000	3,000	70,39	5,535
	2000	3,301	72,22	5,589
Doxorubicin	6,25	0,796	69,17	5,501
	12,5	1,097	69,54	5,511
	25	1,398	75,64	5,694
	50	1,699	86,41	6,098
	100	2,000	99,99**	8,719

Keterangan:

* nilai kematian sel 0% disesuaikan menjadi 0,01% agar dapat ditransformasikan ke probit.

** nilai kematian sel $\geq 100\%$ disesuaikan menjadi 99,99% agar dapat ditransformasikan ke probit.

Berdasarkan analisis regresi probit, ekstrak etanol daun akasia mangium menghasilkan persamaan regresi:

$$y = 1,5199x + 1,1980$$

dengan nilai $R^2 = 0,8060$, sedangkan doxorubicin menghasilkan persamaan regresi:

$$y = 2,333x + 3,043$$

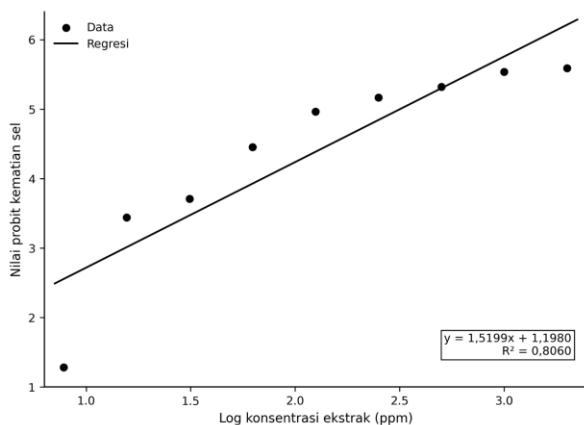
Nilai IC₅₀ ditentukan dengan mensubstitusikan nilai probit 5, yang ekuivalen dengan 50% kematian sel, ke dalam masing-masing persamaan regresi. Hasil perhitungan menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun akasia mangium memiliki nilai IC₅₀ sebesar 317,33 ppm, sedangkan doxorubicin memiliki nilai IC₅₀ sebesar 6,90 ppm terhadap sel kanker serviks HeLa.

Hubungan antara log konsentrasi dan respons kematian sel setelah transformasi probit menunjukkan kecenderungan peningkatan respons sitotoksik seiring meningkatnya konsentrasi perlakuan. Nilai IC₅₀ ekstrak yang jauh lebih tinggi dibandingkan doxorubicin menunjukkan bahwa aktivitas sitotoksik ekstrak etanol daun akasia mangium masih lebih rendah daripada kontrol positif. Berdasarkan kriteria sitotoksitas ekstrak tumbuhan, nilai IC₅₀ sebesar 317,33 ppm menempatkan ekstrak dalam kategori sitotoksik lemah, sedangkan

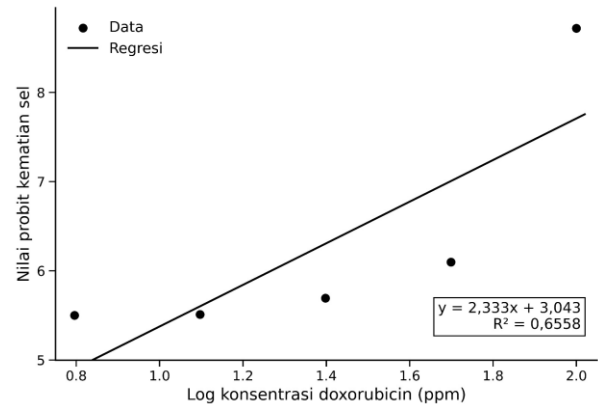
doxorubicin menunjukkan aktivitas sitotoksik yang sangat kuat. Perbedaan ini dapat dipahami karena doxorubicin merupakan senyawa kemoterapi murni dengan mekanisme aksi yang spesifik, sementara ekstrak etanol daun akasia mangium masih berupa ekstrak kasar yang mengandung campuran senyawa aktif dan nonaktif dalam kadar yang bervariasi.

Meskipun demikian, aktivitas sitotoksik yang ditunjukkan ekstrak etanol daun akasia mangium tetap mengindikasikan adanya potensi biologis terhadap sel HeLa secara *in vitro*. Potensi tersebut diduga berkaitan dengan keberadaan metabolit sekunder seperti flavonoid, fenolik, tanin, alkaloid, saponin, dan terpenoid yang terdeteksi pada skrining fitokimia. Oleh karena itu, hasil ini mendukung perlunya penelitian lanjutan melalui fraksinasi, isolasi senyawa aktif, uji selektivitas terhadap sel normal, serta kajian mekanisme molekuler untuk mengidentifikasi komponen yang paling berperan terhadap aktivitas sitotoksik ekstrak.

Hubungan antara log konsentrasi ekstrak etanol daun akasia mangium maupun doxorubicin terhadap nilai probit persentase kematian sel HeLa disajikan pada Gambar 3 dan 4.



Gambar 3. Kurva regresi linear probit ekstrak etanol daun akasia mangium terhadap sel HeLa



Gambar 4. Kurva regresi linear probit Doxorubicin terhadap sel HeLa

Analisis Statistik

Hasil uji One-Way ANOVA terhadap data absorbansi sel HeLa menunjukkan bahwa variasi konsentrasi ekstrak etanol daun akasia mangium berpengaruh signifikan terhadap respons sel, dengan nilai F hitung 626,73 dan $p = 2,09 \times 10^{-20}$ ($p < 0,05$). Hasil ini menegaskan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak menurunkan viabilitas sel HeLa secara bermakna dan mendukung pola aktivitas sitotoksik yang bersifat dosis-respons. Selanjutnya, nilai IC_{50} ditentukan melalui regresi linear probit antara log konsentrasi dan probit persentase kematian sel untuk memperoleh estimasi konsentrasi yang menyebabkan 50% kematian sel.

Interpretasi Aktivitas Sitotoksik

Nilai IC_{50} digunakan untuk menggambarkan potensi sitotoksik suatu senyawa atau ekstrak, yaitu konsentrasi yang diperlukan untuk menimbulkan 50% kematian sel; semakin kecil nilai IC_{50} , semakin kuat aktivitas sitotoksiknya. Pada penelitian ini, ekstrak etanol daun akasia mangium menunjukkan nilai IC_{50} sebesar 317,33 ppm terhadap sel HeLa berdasarkan analisis regresi linear probit. Berdasarkan klasifikasi aktivitas sitotoksik ekstrak tumbuhan yang banyak digunakan dalam penelitian fitofarmaka, ekstrak dengan nilai $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$ dikategorikan sangat kuat, 21–200 $\mu\text{g/mL}$ sedang, 201–500 $\mu\text{g/mL}$ lemah, dan $>500 \mu\text{g/mL}$ tidak aktif. Berdasarkan kriteria tersebut, ekstrak etanol daun akasia mangium dengan nilai IC_{50} sebesar 317,33 $\mu\text{g/mL}$

termasuk dalam kategori sitotoksik lemah (*weak cytotoxicity*) (Alfarraj et al., 2023; Elansary et al., 2024).

Meskipun demikian, aktivitas tersebut tetap menunjukkan adanya potensi biologis dari daun akasia mangium sebagai sumber kandidat antikanker berbasis bahan alam. Potensi tersebut menjadi lebih bermakna apabila dibandingkan dengan doxorubicin sebagai kontrol positif. Pada penelitian ini, doxorubicin menunjukkan nilai IC_{50} sebesar 6,91 ppm, yang berarti aktivitas sitotoksiknya jauh lebih kuat dibandingkan ekstrak etanol daun akasia mangium. Perbedaan tersebut dapat dipahami karena doxorubicin merupakan agen kemoterapi dengan aktivitas sitotoksik yang sangat kuat melalui beberapa mekanisme, termasuk interkalasi DNA, penghambatan enzim topoisomerase II, serta pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) yang menginduksi kerusakan DNA dan apoptosis. Sebaliknya, ekstrak etanol daun akasia mangium masih berupa ekstrak kasar yang mengandung campuran berbagai senyawa bioaktif dan nonaktif sehingga potensi sitotoksiknya belum terfokus pada komponen aktif tertentu (Bisht et al., 2024; Sritharan & Sivalingam, 2021). Aktivitas sitotoksik ekstrak diduga berkaitan dengan keberadaan flavonoid, tanin, fenolik, alkaloid, saponin, dan terpenoid yang terdeteksi pada skrining fitokimia, yang diketahui dapat menghambat proliferasi sel kanker melalui induksi apoptosis, penghentian siklus sel, modulasi jalur pensinyalan, dan peningkatan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS).

Namun, hasil penelitian ini masih perlu ditafsirkan secara hati-hati karena pengujian hanya dilakukan pada satu lini sel kanker, menggunakan ekstrak kasar, belum disertai uji selektivitas terhadap sel normal maupun kajian mekanisme aksi, serta identitas botani sampel belum dikonfirmasi melalui determinasi taksonomi formal. Oleh karena itu, penelitian lanjutan perlu diarahkan pada determinasi botani formal, fraksinasi dan isolasi senyawa aktif, uji selektivitas, pengujian pada beberapa lini sel kanker, serta evaluasi mekanisme aksi dan aktivitas *in vivo*.

SIMPULAN

Ekstrak etanol daun akasia mangium menunjukkan aktivitas sitotoksik *in vitro* terhadap sel kanker serviks HeLa dengan nilai IC_{50} sebesar 317,33 ppm, sehingga tergolong sitotoksik lemah. Peningkatan konsentrasi ekstrak diikuti oleh peningkatan kematian sel, yang menunjukkan adanya hubungan dosis–respons. Temuan ini mengindikasikan bahwa daun akasia mangium berpotensi sebagai sumber kandidat senyawa antikanker berbasis bahan alam, meskipun aktivitasnya masih lebih rendah dibandingkan doxorubicin sebagai kontrol positif. Oleh karena itu, diperlukan penelitian lanjutan melalui fraksinasi, isolasi senyawa aktif, uji selektivitas terhadap sel normal, serta kajian mekanisme aksi dan aktivitas *in vivo* untuk memperkuat potensi farmakologisnya.

SARAN

Penelitian lanjutan perlu dilengkapi dengan determinasi taksonomi formal dan dokumentasi spesimen rujukan untuk memperkuat validitas identitas bahan tanaman. Selain itu, diperlukan fraksinasi, isolasi, dan karakterisasi senyawa aktif dari ekstrak etanol daun akasia mangium untuk mengidentifikasi komponen yang berperan terhadap aktivitas sitotoksik. Kajian berikutnya juga perlu mencakup uji selektivitas terhadap sel normal, pengujian pada beberapa lini sel kanker, analisis mekanisme aksi—seperti apoptosis, siklus sel, dan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS)—serta validasi *in vivo* guna menilai potensi farmakologis ekstrak secara lebih komprehensif.

DAFTAR PUSTAKA

- Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020). Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 12(1), 1–10.
https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19
- Al-Rimawi, F., Abu-Lafi, S., Abbadi, J., et al. (2021). Phytochemical and biological activities of *Acacia* species. *Molecules*,

- 26(15), 4567.
<https://doi.org/10.3390/molecules26154567>
- Albuquerque, B. R., Heleno, S. A., Oliveira, M. B. P. P., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2021). The hallmarks of flavonoids in cancer. *Molecules*, 26(7), 2029. <https://doi.org/10.3390/molecules26072029>
- Alfarraj, S., Al-Rejaie, S. S., Alaqil, F. A., Elshikh, M. S., & Elshafie, H. S. (2023). Cytotoxic activity of medicinal plant extracts against human cancer cell lines: A review of in vitro studies. *Plants*, 12(8), 1654. <https://doi.org/10.3390/plants12081654>
- Ameer, K., Shahbaz, H. M., & Kwon, J.-H. (2023). A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants. *Scientific African*, 19, e01585. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2023.e01585>
- Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., & Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: Advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(3), 200–216. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>
- Bisht, A., Sharma, S., Kumari, P., & Singh, S. (2024). Doxorubicin in cancer therapy: Recent advances in molecular mechanisms, toxicity, and therapeutic strategies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 170, 116027. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.116027>
- CCRC. (2020). *Protokol uji sitotoksik metode MTT*. Cancer Chemoprevention Research Center, Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada.
- Elansary, H. O., Mahmoud, E. A., El-Ansary, D. O., & Szopa, A. (2024). Plant-derived cytotoxic compounds and their potential as anticancer agents: Recent advances. *Molecules*, 29(3), 604. <https://doi.org/10.3390/molecules29030604>
- Finney, D. J. (1971). *Probit analysis* (3rd ed.). Cambridge University Press.
- Freshney, R. I. (2021). *Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications* (8th ed.). Wiley-Blackwell.
- Gavanji, S., Bakhtari, A., Famurewa, A. C., & Othman, E. M. (2023). Cytotoxic activity of herbal medicines as assessed *in vitro*: A review. *Chemistry & Biodiversity*, 20(2), e202201098. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202201098>
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12827. <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>
- Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., & Capanoglu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, 1(3), 332–349. <https://doi.org/10.1002/fft2.44>
- Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Savickas, A., & Bernatoniene, J. (2020). Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*, 12(2), 457. <https://doi.org/10.3390/nu12020457>
- Liu, M., Kruszewski, S., Wang, Y., Li, X., Zhang, Z., & Wu, X. (2023). Disparities in cisplatin-induced cytotoxicity—A meta-analysis of selected cancer cell lines. *Molecules*, 28(15), 5761. <https://doi.org/10.3390/molecules28155761>
- Maugeri, A., Lombardo, G. E., Cirmi, S., Süntar, I., Barreca, D., Laganà, G., & Navarra, M. (2022). Pharmacology and toxicology of tannins. *Archives of Toxicology*, 96(5), 1257–1277. <https://doi.org/10.1007/s00204-022-03250-0>
- National Cancer Institute. (2023). *Cancer treatment*. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment>
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2016). Cell viability assays. In G. S. Sittampalam et al. (Eds.), *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for

- Advancing Translational Sciences. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
- Selvamuthukumar, M., & Shi, J. (2024). Extraction and purification of bioactive compounds from plant materials. In *Reference Module in Food Science*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.23228-1>
- Shaikh, J. R., & Patil, M. K. (2020). Qualitative tests for preliminary phytochemical screening: An overview. *International Journal of Chemical Studies*, 8(2), 603–608. <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i2i.8834>
- Sharma, S., Das, M., Yadav, A., & Bhattacharya, S. (2023). Bioactive compounds of acacia, health benefits and its utilization in food processing industry: A critical review. *Nutrition & Food Science*, 53(7), 1125–1146. <https://doi.org/10.1108/NFS-08-2022-0274>
- Sritharan, S., & Sivalingam, N. (2021). A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin. *Life Sciences*, 278, 119527. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119527>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Tungmunthum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A., & Yangsabai, A. (2018). Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. *Medicines*, 5(3), 93. <https://doi.org/10.3390/medicines5030093>
- U.S. Environmental Protection Agency. (1991). *Statistical approach to predicting chronic toxicity of chemicals to fishes from acute toxicity test data* (EPA/600/R-92/236). U.S. Environmental Protection Agency.
- Wendlocha, D., Kubina, R., Krzykowski, K., & Mielczarek-Palacz, A. (2024). Selected flavonols targeting cell death pathways in cancer therapy: The latest achievements in research on apoptosis, autophagy, necroptosis, pyroptosis, ferroptosis, and cuproptosis. *Nutrients*, 16(8), 1201. <https://doi.org/10.3390/nu16081201>
- World Health Organization. (2024). *Cancer*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Yanti, W. N., Hulrahma, M., Aprilia, K. A., Roza, A., Ilham, K., & Maliza, R. (2024). Systematic review: Cytotoxicity test of bioactive compounds of Asteraceae family plant extracts on HeLa cell line. *Jurnal Biologi Tropis*, 24(4), 24–32. <https://doi.org/10.29303/jbt.v24i4.7007>
- Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13, 20. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>