

# Pengaruh Ekstrak Etanol *Peronema canescens* Jack terhadap Ekspresi Gen *Tumor Necrosis Factor Alpha* pada Sel HeLa

Hafiznie Ansharina<sup>1\*</sup>, Gusti Revilla<sup>2</sup>, Husnil Kadri<sup>3</sup>, Desmawati<sup>4</sup>, Elfira Yusri<sup>5</sup>, Hirowati Ali<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Bagian Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Padang, Indonesia

<sup>2</sup> Bagian Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Padang, Indonesia

<sup>3</sup> Bagian Biokimia, Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Padang, Indonesia

<sup>4</sup> Bagian Ilmu Gizi, Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Padang, Indonesia

<sup>5</sup> Bagian Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Padang, Indonesia

<sup>6</sup> Bagian Biokimia, Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Padang, Indonesia

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

## Abstrak

**Latar Belakang:** Kanker serviks merupakan kanker yang menduduki peringkat keempat pada wanita di seluruh dunia. Kanker ini disebabkan oleh *Human Papillomavirus* (HPV) tipe resiko tinggi yang menyerang sel-sel leher rahim. Sel kanker akan mensekresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- $\alpha$ ) untuk menjadikan lingkungan mikrotumor mendukung bagi kelangsungan hidup sel kanker. Terapi kanker serviks yang umum digunakan adalah pembedahan, radioterapi, dan kemoterapi. Terapi lain yang juga digunakan adalah tanaman herbal, contohnya sungkai. Ekstrak etanol daun sungkai (*Peronema canescens* J) mengandung senyawa yang berperan sebagai antiinflamasi dan antioksidan. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pemberian ekstrak etanol daun sungkai dalam menurunkan ekspresi gen TNF- $\alpha$  pada sel HeLa. **Metode:** Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* dengan *post test only control group design* yang menggunakan *24 well plate* kultur sel HeLa yang tumbuh secara konfluens. Sampel dibagi menjadi empat kelompok (K, P1, P2, dan P3). Kelompok perlakuan diberikan ekstrak etanol daun sungkai dengan konsentrasi *inhibition concentration* (IC)25, IC50, dan IC75 yang diinkubasi selama 24 jam. Sel yang telah diberi perlakuan akan dipanen untuk dilakukan isolasi RNA. Pemeriksaan gen TNF- $\alpha$  dilakukan menggunakan PCR Konvensional, kemudian *band* elektroforesis berukuran 47 bp dianalisis menggunakan *ImageJ*. **Hasil:** Data didapatkan dari analisis ketebalan *band* elektroforesis yang diukur menggunakan *ImageJ*. Analisis data dilakukan menggunakan uji One Way ANOVA dan Post Hoc Bonferroni, didapatkan rerata ekspresi gen TNF- $\alpha$  pada kelompok K, P1, P2, dan P3 secara berturut-turut adalah 0,32; 0,29; 0,23; dan 0,14. Terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok K terhadap P2 dan P3 dengan nilai  $p=0,000$  ( $p<0,05$ ), sedangkan kelompok K dengan P1 perbedaannya tidak bermakna ( $p>0,05$ ). **Kesimpulan:** Pemberian ekstrak etanol daun sungkai pada konsentrasi IC50 dan IC75 mampu menurunkan ekspresi gen TNF- $\alpha$  pada kelompok sel HeLa.

**Kata Kunci :** Ekstrak Etanol, Kanker Serviks, Sel HeLa, Sungkai (*Peronema canescens*), Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ).

## Abstract

**Background:** Cervical cancer is the fourth most common cancer in women worldwide. This cancer is caused by a high-risk Human Papillomavirus (HPV) that attacks cervical cells. Cancer cells will secrete Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) to create a microtumor environment supportive of cancer survival. The common therapies for cervical cancer are surgery, radiotherapy, and chemotherapy. Other therapies that are also used are herbal plants, for example, sungkai. Sungkai leaf ethanol extract (*Peronema canescens*) contains compounds that act as anti-inflammatories and antioxidants. **Objective:** This study aimed to determine the

*administration of sungkai leaf ethanol extract on reducing TNF- $\alpha$  gene expression in HeLa cells. **Methods:** This study was a true experimental study with a post-test-only control group design using 24 well plates of HeLa cell culture growing confluent. Samples were divided into four groups (K, P1, P2, and P3). The treated group was administered with sungkai leaf ethanol extract at concentrations of inhibition concentration (IC)<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub>, and IC<sub>75</sub> which were incubated for 24 hours. The cells that have been treated will be harvested for RNA isolation. The TNF- $\alpha$  gene was examined using conventional PCR, and then the 47 bp electrophoretic bands were analyzed using ImageJ. **Results:** Data was obtained from the analysis of electrophoresis band thickness measured using ImageJ. Data analysis was carried out using One-Way ANOVA and Post-Hoc Bonferroni. The mean expression of the TNF- $\alpha$  gene in groups K, P1, P2, and P3 was 0.32, respectively; 0.29; 0.23; and 0.14. There was a significant difference between group K and P2 and P3, with a value of  $p=0.000$  ( $p<0.05$ ), while the difference between group K and P1 was not significant ( $p>0.05$ ). **Conclusion:** Administration of sungkai leaf ethanol extract at IC<sub>50</sub> and IC<sub>75</sub> concentrations was able to reduce TNF- $\alpha$  gene expression in the HeLa cell group.*

**Keywords:** *Cervical Cancer, HeLa Cells, Ethanol Extract, Sungkai (Peronema canescens), Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ).*

## I. PENDAHULUAN

Kanker serviks merupakan pertumbuhan abnormal pada sel-sel segmen bawah rahim akibat kehilangan mekanisme kontrol, sehingga dapat bermigrasi dan menginvasi sel-sel normal lainnya.<sup>1</sup> Kanker ini menempati urutan keempat terbanyak mengenai wanita di seluruh dunia. Pada tahun 2018 terdapat 570.000 wanita terdiagnosis kanker serviks di seluruh dunia.<sup>2</sup> Di Indonesia insiden kanker serviks menduduki peringkat kedua dengan persentasi 9,2% kasus baru dan mortalitas sebanyak 9,0%.<sup>3</sup> Data dari Dinas Kesehatan Padang tahun 2017 menunjukkan kejadian kanker serviks di Kota Padang menduduki peringkat pertama se-Sumatera Barat.<sup>4</sup>

Kejadian kanker serviks dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu usia pertama kali melakukan hubungan seksual, berganti-ganti pasangan seksual, multiparitas, penggunaan kontrasepsi hormonal, dan usia di atas 40 tahun.<sup>5</sup> Kanker ini disebabkan oleh infeksi *high-risk Human Papillomavirus* (HR-HPV). Tipe *high-risk* yang paling sering ditemukan adalah HPV 16+ (SiHa), yang menyumbang sekitar 70% dari kasus kanker serviks dan HPV 18+ (HeLa) yang menyumbang sebanyak 20%.<sup>6,7</sup> HPV akan masuk ke dalam stratum germinativum serviks melalui mikrotrauma, kemudian virus akan bereplikasi. Pada umumnya infeksi HPV bersifat sementara dan dapat sembuh dalam 30 bulan karena adanya perlawanan dari sistem imun, namun pada individu tertentu infeksi dapat menjadi persisten dan memicu perkembangan kanker.<sup>8</sup>

*Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- $\alpha$ ) merupakan sitokin proinflamasi yang disekresikan secara spontan dalam jumlah yang sedikit pada sel kanker serviks.<sup>9</sup> TNF- $\alpha$  adalah sitokin multifungsi yang memainkan peran dalam inflamasi, apoptosis, dan sistem imun. Sitokin ini dapat mempromosikan tumorigenesis dan berperan besar dalam proliferasi sel kanker,

transformasi sel, *cell survival*, invasi, dan metastasis kanker.<sup>10</sup>

Terapi yang umum digunakan dalam pengobatan kanker serviks, yaitu bedah, kemoterapi, dan radioterapi. Bedah digunakan untuk mengangkat massa kanker serviks pada stadium awal, namun memiliki efek samping berupa infertilitas dan rekurensi dari kanker. Radioterapi dan kemoterapi digunakan untuk kanker yang sudah bermetastasis, tetapi efek samping yang ditimbulkan dapat berupa keluhan lokal maupun sistemik yang berat.<sup>11</sup> Keluhan lokal pasien dengan radioterapi dan kemoterapi dapat berupa kemerahan hingga pengelupasan kulit di area yang terkena radiasi, rasa nyeri atau terbakar pada kulit, sistitis radiasi, nyeri pada vagina, rambut rontok, dan mulut kering.<sup>12</sup> Sedangkan keluhan sistemik dapat berupa rasa mudah lelah, mual dan muntah, diare, perubahan siklus menstruasi, anemia, leukopenia, dan trombositopenia.<sup>12,13</sup>

*World Health Organization* (WHO) merekomendasikan untuk kembali memanfaatkan sumber daya yang ada (*back to nature*) untuk meminimalisir efek samping yang ditimbulkan modalitas sebelumnya.<sup>14</sup> Tanaman obat merupakan salah satu sumber daya potensial di Indonesia yang dapat dimanfaatkan sebagai terapi kombinasi dalam pengobatan kanker bersama modalitas bedah, radioterapi, dan kemoterapi. Penggunaannya dapat meningkatkan efektivitas terapi sekaligus mengurangi efek samping dan komplikasi.<sup>15</sup> Salah satu tanaman yang menjanjikan adalah sungkai (*Peronema canescens* Jack), yang memiliki kandungan fitokimia beragam, seperti flavonoid, alkaloid, steroid, triterpenoid, tanin, fenol, dan saponin, sehingga berpotensi kuat sebagai agen antikanker.<sup>16</sup> Daun Sungkai mengandung tujuh senyawa khusus, diterpenoid tipe *clerodane* (peronemin A2, A3, B1, B2, B3, C1, dan D1), yang terbukti memiliki efek sitotoksik signifikan terhadap sel kanker.<sup>17,18</sup> Penelitian

menunjukkan bahwa ekstrak daun Sungkai memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel adenokarsinoma kolon HT-29 dengan nilai IC50 yang rendah (14,807 µg/mL), mengindikasikan kemampuannya untuk menghambat proliferasi sel kanker.<sup>19</sup> Hal ini didukung oleh aktivitas antioksidan yang tinggi (IC50 29,549 µg/mL), untuk mencegah stres oksidatif, salah satu pemicu utama kanker.<sup>20</sup>

Kelebihan tanaman Sungkai dibandingkan tanaman obat lainnya adalah mekanisme kerja senyawa bioaktifnya yang unik. Peronemin telah terbukti secara *in silico* sebagai inhibitor Dihidrofolat Reduktase (DHFR), enzim kunci dalam sintesis tetrahidrofolat yang mendukung proliferasi sel. Selain itu, senyawa ini berinteraksi dengan subunit saluran ion kalium Kv1.3, yang terlibat dalam regulasi pertumbuhan limfosit T, membuka peluang mekanisme antikanker tambahan. Di sisi lain, meskipun banyak tanaman telah dieksplorasi untuk sifat antikankernya, potensi Sungkai masih relatif kurang diteliti.<sup>21</sup> Penelitian ini menggunakan ekstrak etanol daun sungkai (*Peronema canescens* Jack), yang memiliki kandungan fitokimia unik dan potensi sitotoksik tinggi, sebagai agen antikanker dalam menurunkan ekspresi gen TNF-α pada sel HeLa kanker serviks. Metode analisis yang digunakan, seperti PCR konvensional dan *software ImageJ*, memberikan pendekatan presisi tinggi yang belum banyak diaplikasikan dalam penelitian serupa.

## II. BAHAN DAN METODE

### A. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *falcon tube* 50 mL dan 15 mL, pipet tip 1000 µL, 200 µL, dan 10 µL. *Syringe filtered* 0,22 µm dan spuit 5 mL. *Centrifuge tube* kapasitas 1,5 mL dan 0,5 mL, serta *microcentrifuge tube* 0,5 mL dan 1 mL. *Tissue culture flask* 25 cm<sup>2</sup> dan *24 well plate* untuk media kultur sel. Pipet tor 1000 µl, 200 µl, dan 10 µl, inkubator CO<sub>2</sub>, sentrifus

dari Thermo Fisher Scientific. Penelitian ini juga memanfaatkan timbangan analitik, *waterbath*, dan *Laminar Air Flow* (LAF). Mikroskop *inverted*, Nanodrop, dan mesin PCR (Bio-Rad).

### B. Bahan

Bahan yang digunakan selama penelitian berupa ekstrak daun Sungkai (*Peronema canescens*), *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (D-MEM) *high glucose* (Sigma), penisilin/streptomisin, *amphotericin B*, *Fetal Bovine Serum* (FBS) (Sigma), *Trypsin-EDTA* 0,25% (Sigma), *Trypan blue*, *Phosphate Buffered Saline* (PBS) (Sigma), aquades steril (Andeska Laboratory), natrium bikarbonat (NaHCO<sub>3</sub>), parafilm, Trizol (Genezol), isopropanol, kloroform (Sigma), etanol 70%, *RNAse free water* (Sigma), kit cDNA (Sensifast), primer gen GAPDH, dan primer gen TNF-α (Integrated DNA Technologies).

### C. Metode

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* dengan *post-test-only control group design*. Populasi yang digunakan adalah sel kultur HeLa 1x10<sup>5</sup> sel/mL per 24 *well plate* yang tersimpan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas. Untuk mendapatkan konsentrasi 1x10<sup>5</sup> sel/mL per 24 *well plate*, dimulai dengan menghitung jumlah sel dalam suspensi awal menggunakan hemocytometer. Misalnya, konsentrasi awal sel adalah 5x10<sup>6</sup> sel/mL, maka perlu dilakukan pengenceran untuk mencapai konsentrasi target. Proses pengenceran menggunakan rumus:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

C<sub>1</sub> sebagai konsentrasi awal sel (5x10<sup>6</sup> sel/mL), V<sub>1</sub> sebagai volume sel yang diambil, C<sub>2</sub> sebagai konsentrasi akhir yang diinginkan (1x10<sup>5</sup> sel/mL), dan V<sub>2</sub> sebagai volume akhir yang dibutuhkan. Misalkan volume akhir yang diinginkan adalah 24 mL (masing-masing 1 mL per *well plate*). Dengan memasukkan nilai tersebut ke dalam

rumus:

$$(5 \times 10^6 \text{ sel/mL}) \times V_1 = (1 \times 10^5 \text{ sel/mL}) \times 24 \text{ mL}$$
$$V_1 = \frac{(1 \times 10^5 \text{ sel/mL}) \times 24 \text{ mL}}{(5 \times 10^6 \text{ sel/mL})} = 0,48 \text{ mL}$$

Artinya, ambil 0,48 mL dari suspensi sel awal dan tambahkan 23,52 mL medium D-MEM untuk mendapatkan total volume 24 mL dengan konsentrasi  $1 \times 10^5$  sel/mL. Setelah pengenceran, pipet 1 mL suspensi sel ke masing-masing *well plate* pada 24 *well plate*. Sehingga diperoleh  $1 \times 10^5$  sel/mL dalam 1 *well plate*.

Sampel penelitian terbagi menjadi empat kelompok, yaitu kelompok kontrol (K), Perlakuan 1 (P1), Perlakuan 2 (P2), dan Perlakuan 3 (P3). Kelompok perlakuan diberikan ekstrak etanol daun sungkai, dengan *Inhibition Concentration* (IC25, IC50, dan IC75) selama 24 jam dan diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%. Setiap kelompok dilakukan pengulangan sebanyak enam kali. Pengambilan sampel dilakukan secara acak (*simple random sampling*).

#### D. Ekstraksi Daun Sungkai

Daun sungkai diperoleh dari Hutan Pendidikan Biologi Universitas Andalas dan diproses melalui metode maserasi. Sebanyak 1 kg daun sungkai dicuci hingga bersih dipotong kecil-kecil, dan dikeringkan. Daun kering dihaluskan menjadi simplisia menggunakan grinder. Simplisia dilarutkan dalam etanol 70% dengan perbandingan 1:10 dan direndam selama 3x24 jam, kemudian disaring menggunakan kain kasa dan kertas saring untuk memisahkan residu. Proses maserasi diulang dengan etanol baru hingga larutan tidak berwarna, lalu larutan encer diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 45°C untuk menghasilkan ekstrak pekat. Larutan stok dibuat dengan melarutkan 1 mg ekstrak pekat dalam 1 mL medium komplit untuk mencapai konsentrasi 1000 µg/mL, yang kemudian diencerkan dengan medium kultur untuk memperoleh serial konsentrasi IC25, IC50, dan IC75

berdasarkan hasil uji sitotoksitas.

#### E. Isolasi RNA

Sampel yang telah diberi perlakuan dipanen dan mencucinya menggunakan PBS. Selanjutnya dilakukan isolasi RNA menggunakan reagen Trizol. Sel digerus hingga terlepas, lalu suspensi dipipet dan dipindahkan ke *microtube* 1,5 mL, kemudian disimpan di dalam kulkas semalaman. Tambahkan 200 µL kloroform, tube dibolak-balik dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu kamar. Kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000×g di suhu 4°C selama 15 menit. Lapisan atas (*aqueous phase*) dipindahkan ke *microtube* steril, kemudian ditambahkan isopropanol dua kali volume larutan, diinkubasi 10 menit, dan disentrifugasi lagi dengan kondisi yang sama. Pelet RNA dicuci dengan 350 µL etanol 70%, dibolak-balik perlahan, dan disentrifugasi pada 7.500×g di suhu 4°C selama 5 menit. Supernatan dibuang, dan pelet dikeringkan menggunakan vakum sentrifuge selama 10 menit, kemudian dilarutkan dalam 25–40 µL *RNAse Free Water*.

#### F. Sintesis cDNA

Sintesis cDNA dilakukan dengan menggunakan kit sintesis. Komposisi sintesis cDNA total adalah 5 µg RNA total, 1x RT buffer, 20 pmol oligo dT, 4 mM dNTP, 10 mM DTT, 40 U enzim SuperScript TMII RTase dan Nuclease Free Water dengan volume reaksi 20 µl. Sintesis cDNA total dilakukan pada suhu 52°C selama 50 menit dengan protokol kerja sesuai dengan manual kit.

#### G. PCR

cDNA yang diperoleh diamplifikasi menggunakan *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) (Bio-Rad). Amplifikasi dilakukan menggunakan primer gen *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase* (GAPDH) sebagai *housekeeping* dan gen *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF-α) yang diperoleh dari

Integrated DNA Technologies (kode 99062406). Susunan sekuens *forward* 5'-GGCTGATTAGAGAGAGGTCC-3' dan *reverse* 3'-GGGCCTAGTACGAAAGTCACCC-5', dengan panjang 20 bp. Proses PCR diamplifikasi selama 35 siklus, terdiri dari predenaturasi 95° selama 3 menit, denaturasi 95° selama 30 detik, annealing 58,3° selama 30 detik, ekstensi 72° selama 45 detik, dan post ekstensi 72° selama 5 menit.

Visualisasi hasil PCR dilakukan menggunakan elektroforesis gel agarose (Servicebio) selama 60 menit. *Band* TNF- $\alpha$  sebesar 47 bp yang diperoleh dari elektroforesis dianalisis menggunakan *software ImageJ*. Nilai rerata ekspresi gen TNF- $\alpha$  diperoleh dari analisis perbandingan ketebalan band elektroforesis gen TNF- $\alpha$  dan gen GAPDH yang diukur menggunakan *ImageJ*. Analisis data dilakukan menggunakan uji *One Way ANOVA dan Post Hoc Bonferroni*.

### III. HASIL DAN PEMBAHASAN

**TABEL 1. RERATA EKSPRESI GEN TNF-A YANG DIBERIKAN EKSTRAK ETANOL DAUN SUNGKAI DIBANDINGKAN GEN GAPDH**

Kelompok	Sampel	Ratio
Kontrol	K-1	0,26
	K-2	0,31
	K-3	0,34
	K-4	0,32
	K-5	0,36
	K-6	0,33
Rerata:		0,32
Perlakuan 1 (IC25)	P1-1	0,32
	P1-2	0,25
	P1-3	0,29
	P1-4	0,31
	P1-5	0,32
	P1-6	0,30
Rerata:		0,29
Perlakuan 2 (IC50)	P2-1	0,24
	P2-2	0,22
	P2-3	0,29
	P2-4	0,23
	P2-5	0,21
	P2-6	0,20

Rerata:		0,23
Perlakuan 3 (IC75)	P3-1	0,15
	P3-2	0,20
	P3-3	0,13
	P3-4	0,14
	P3-5	0,13
	P3-6	0,11
Rerata:		0,14

Tabel 1 menunjukkan hasil rerata ekspresi gen TNF- $\alpha$  dari analisis *band* elektroforesis menggunakan *ImageJ* pada setiap sampel. Hasil pengukuran ekspresi gen TNF- $\alpha$  pada masing-masing kelompok dilakukan analisis secara statistik. Pengujian yang dilakukan adalah uji normalitas menggunakan Shapiro-Wilk Test dan didapatkan hasil pada kelompok kontrol, ekstrak etanol daun sungkai IC25, IC50, dan IC75 berturut turut adalah 0,611; 0,148; 0,306; dan 0,248 ( $p > 0,05$ ), artinya data dari setiap kelompok berdistribusi normal.

Uji *Levene's* dilakukan untuk melihat kesamaan variasi data. Hasil uji didapatkan nilai  $p$  0,983 ( $p > 0,05$ ) yang artinya data antar kelompok memiliki variasi yang sama. Data tersebut akan dilakukan uji *One Way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan rasio ekspresi gen TNF- $\alpha$  pada setiap kelompok bermakna atau tidak sesuai statistik. Hasil uji dikatakan bermakna apabila nilai  $p < 0,05$ .

**TABEL 1. UJI ONE WAY ANOVA TERHADAP RERATA EKSPRESI GEN TNF-A PADA SEL HELA**

Kelompok	N	Rerata Ekspresi gen TNF- $\alpha$ (Rerata $\pm$ SD)	Nilai $p$
<b>K</b>	6	0,32 $\pm$ 0,03	0,000
<b>P 1</b>	6	0,29 $\pm$ 0,02	
<b>P 2</b>	6	0,23 $\pm$ 0,03	
<b>P 3</b>	6	0,14 $\pm$ 0,03	

Hasil yang diperoleh dari pengujian rasio ekspresi gen TNF- $\alpha$  pada semua kelompok adalah nilai  $p = 0,000$  setelah pemberian ekstrak etanol daun sungkai (*Peronema canescens* J), sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna terjadi pada semua kelompok sel HeLa.

Perbedaan antar kelompok perlakuan pada pemberian ekstrak etanol daun sungkai (*Peronema canescens* J) terhadap ekspresi gen TNF- $\alpha$  pada sel HeLa kanker serviks dapat dianalisis menggunakan uji lanjut *Post Hoc Bonferroni* dengan hasil pada Tabel 3 berikut:

**TABEL 2 UJI POST HOC BONFERRONI TERHADAP RERATA EKSPRESI GEN TNF-A PADA SEL HELa**

Kelompok	K	P1	P2	P3
K	-	1,000	0,000*	0,000*
P1	1,000	-	0,008*	0,000*
P2	0,000*	0,008*	-	0,000*
P3	0,000*	0,000*	0,000*	-

\*: menerangkan hasil yang signifikan

Berdasarkan Tabel 3, terdapat penurunan ekspresi gen TNF- $\alpha$  yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan ekstrak etanol daun sungkai IC50 dan IC75 karena nilai  $p < 0,05$ . Pada kelompok IC25 dengan kelompok kontrol terdapat penurunan ekspresi gen TNF- $\alpha$ , namun tidak signifikan karena nilai  $p > 0,05$ . Penurunan ekspresi gen TNF- $\alpha$  yang paling rendah dengan rerata ratio sebesar 0,14 terdapat pada kelompok perlakuan IC75. Perbedaan ini dapat terjadi karena konsentrasi IC25 belum cukup kuat untuk menurunkan ekspresi gen TNF- $\alpha$  pada sel HeLa dibandingkan dengan kelompok IC50 dan IC75. Efek farmakologis suatu obat akan muncul jika terjadi interaksi antara obat dan reseptor. Intensitas efek obat berbanding lurus dengan fraksi reseptor yang diikat, fraksi reseptor bergantung pada besar dosis dan lamanya paparan.<sup>22</sup> Semakin besar dosis dan semakin lama paparan maka semakin besar penurunan ekspresi gen TNF- $\alpha$ .

TNF- $\alpha$  merupakan sitokin proinflamasi yang diproduksi oleh sel-sel imun tubuh, seperti limfosit T, sel *natural killer* (NK), makrofag yang teraktivasi serta sel tumor walau dalam jumlah yang terbatas. Sitokin ini merupakan bentuk respon tubuh terhadap sejumlah penyakit infeksi yang dapat disebabkan oleh bakteri, virus, jamur, dan parasit.<sup>23</sup> TNF- $\alpha$  memiliki peran dalam kondisi fisiologis,

seperti perkembangan tubuh dan imunitas, serta dalam kondisi patologis yang merespon terhadap inflamasi dan pertumbuhan tumor.<sup>24</sup> Pada inflamasi kronis, TNF- $\alpha$  merangsang sel-sel inflamasi memproduksi leukotrien serta spesies reaktif oksigen dan nitrogen yang menyebabkan kerusakan DNA.<sup>8</sup>

Pada sel kanker TNF- $\alpha$  memiliki dua peran yang berbeda. Sebagai antikanker TNF- $\alpha$  menginduksi kematian sel melalui apoptosis dan nekrosis.<sup>25</sup> Sebaliknya, TNF- $\alpha$  dapat mempromosikan pertumbuhan sel kanker melalui reaksi inflamasi dengan mengaktifkan jalur pensinyalan *nuclear factor kappa beta* (NF- $\kappa$ B) yang menghambat kematian sel prekanker atau memicu transformasi sel. TNF- $\alpha$  juga terbukti menjadi mutagen yang menyebabkan kerusakan DNA melalui induksi *reactive oxygen species* (ROS).<sup>26</sup> Jalur pensinyalan apoptosis dan inflamasi yang dimodulasi oleh TNF- $\alpha$  memiliki persamaan, yaitu ligan TNF- $\alpha$  akan berikatan dengan reseptornya *TNF- $\alpha$  Receptor* (TNFR-1) dan berinteraksi dengan *TNFR-1 Associated Death Domain* (TRADD) via *Death Domain* (DD). Perbedaannya pada pensinyalan apoptosis, TRADD akan berikatan dengan molekul lain yang sama-sama memiliki *Death Domain*, sedangkan pada mekanisme inflamasi TRADD akan berinteraksi dengan *TNFR Associated Factor* (TRAF2), TRAF5, dan *Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein* (cIAP) yang akan menginisiasi ekspresi gen dari sitokin proinflamasi, kemokin, faktor pertumbuhan, dan TNF- $\alpha$  itu sendiri.<sup>24</sup>

Peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$  pada lesi berkaitan dengan progresifitas dan keganasan dari sel kanker serviks.<sup>27</sup> Hal ini membuktikan bahwa inflamasi kronis berperan dalam karsinogenesis serviks yang disebabkan oleh infeksi HPV. TNF- $\alpha$  berkontribusi terhadap persistensi HPV dan perkembangan neoplastik dengan meningkatkan ekspresi gen virus. Sitokin ini juga meningkatkan proliferasi dari *cell line*

kanker serviks melalui peningkatan amphiregulin, yaitu ligand *epidermal growth factor receptor* (EGFR).<sup>28</sup>

Pada penelitian ini terdapat penurunan ekspresi gen TNF- $\alpha$  yang disebabkan oleh pemberian ekstrak etanol daun sungkai (*Peronema canescens* J). Hal ini disebabkan karena daun sungkai memiliki senyawa metabolit sekunder berupa flavonoid, alkaloid, steroid, tanin, fenol dan saponin yang berperan sebagai antioksidan.<sup>16</sup> Berdasarkan penelitian yang dilakukan Dista, et.al (2022) lima dari tujuh kandungan daun sungkai dari hasil nanoemulsi adalah golongan flavonoid, seperti eupatilin sebagai senyawa paling dominan dalam daun sungkai.<sup>29</sup> Senyawa flavonoid pada daun sungkai berperan dalam menghambat degradasi inhibitor NF-kB (IkB), dan memblokir aktivitas IkB kinase (IKK), sehingga dapat menekan sekresi sitokin proinflamasi (TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6, dan IL-18) dan menurunkan inflamasi.<sup>30</sup>

Pada penelitian lain oleh Fikriansyah et.al (2023), daun sungkai mengandung tujuh senyawa khusus, yaitu diterpenoid tipe *clerodane* (peronemin A2, A3, B1, B2, B3, C1, dan D1), yang terbukti memiliki efek antikanker melalui inhibisi Dihidrofolat Reduktase (DHFR), yang merupakan enzim kunci dalam sintesis tetrahidrofolat yang mendukung proliferasi sel. Selain itu, senyawa ini berinteraksi dengan subunit saluran ion kalium Kv1.3, yang terlibat dalam regulasi pertumbuhan limfosit T, serta menginduksi apoptosis melalui regulasi Bcl-2 yang merupakan bagian dari jalur pensinyalan TNF- $\alpha$ .<sup>21</sup>

Kandungan alkaloid pada sungkai terbukti menghambat enzim topoisomerase yang terlibat dalam replikasi DNA dan menginduksi apoptosis melalui jalur pensinyalan caspase. Senyawa ini dapat menurunkan reaksi inflamasi dengan cara menghambat pensinyalan JUN N-terminal kinase (JNK) dan menekan aktivasi NF-kB,

sehingga terjadi penurunan ekspresi gen dari sitokin, kemokin, dan *cell survival*.<sup>31</sup> Saponin berfungsi dalam menekan produksi sitokin proinflamasi, seperti IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, and TNF- $\alpha$ . Penekanan TNF- $\alpha$  merangsang aktivasi protein p38, yang mengatur pensinyalan kinase pada sel untuk memicu terjadinya apoptosis.<sup>32</sup>

Ibrahim et.al (2021) menguji subfraksi kloroform dari daun sungkai (*Peronema canescens* J) terhadap adenokarsinoma kolon HT-29 dan adenokarsinoma kolon primer secara *in vitro*. Hasil uji menunjukkan potensi sitotoksik daun sungkai pada sel kanker HT-29 manusia dengan nilai IC50 sebesar 14,807  $\mu\text{g/mL}$ .<sup>17</sup> Pada sel HT-29 yang diberi dosis IC50 (14,807  $\mu\text{g/mL}$ ) ekstrak sungkai terdapat aktivitas apoptosis sebesar 11,51% dan nekrosis 0,10%. Pada adenokarsinoma kolon primer aktivitas apoptosis sebesar 11,50% dan nekrosis 9,56%.<sup>19</sup> Pada penelitian lain yang dilakukan Ibrahim et.al (2022) terhadap sel HT-29 dan sel HeLa yang diberikan ekstrak kloroform dan etanol daun sungkai dengan dosis IC50, diperoleh nilai IC50 ekstrak kloroform sel HT-29 dan sel HeLa berturut-turut (10,353 dan 38,913  $\mu\text{g/mL}$ ), artinya memiliki aktivitas antikanker yang sedang. Sedangkan pada ekstrak etanol diperoleh nilai IC50 253,190  $\mu\text{g/mL}$  terhadap sel HeLa, artinya memiliki aktivitas antikanker yang lemah.<sup>33</sup> Hal ini membuktikan bahwa tanaman sungkai memiliki potensi sebagai antikanker melalui penghambatan siklus sel, menginduksi apoptosis, dan nekrosis pada sel kanker.<sup>19</sup>

Penelitian ini menggunakan ekstrak etanol daun sungkai dengan konsentrasi IC25, IC50, dan IC75. *Inhibition concentration 50* (IC50) adalah konsentrasi suatu senyawa yang dapat menghambat kelangsungan hidup sel sebanyak 50% dari kontrol.<sup>34</sup> Nilai IC50 ekstrak etanol daun sungkai dapat diketahui dari *microtetrazolium* (MTT) Assay, yaitu suatu uji kolorimetrik untuk menilai sitotoksisitas atau aktivitas sitostatik dari



suatu senyawa. Prinsipnya garam MTT tetrazolium (berwarna kuning) akan direduksi oleh enzim *mitochondrial oxireductase* menjadi formazan (berwarna ungu). Reaksi ini dapat dilakukan jika sel dapat hidup dan *mitochondrial oxireductase* tersedia.<sup>35</sup> Berdasarkan uji ini diperoleh nilai IC25 sebesar 34,28µg/mL, IC50 sebesar 55,08 µg/mL, dan IC75 sebesar 88,51 µg/L

Suatu senyawa dikategorikan sebagai sitotoksik yang kuat apabila nilai IC50 <100 µg/mL, sitotoksik sedang apabila (100 µg/mL < IC50 < 1000 µg/mL), sitotoksik lemah apabila (100 µg/mL < IC50 ≤1000 µg/mL), dan tidak sitotoksik apabila nilai IC50 >1000 µg/mL. Semakin kecil nilai IC50 maka semakin tinggi tingkat sitotoksitas dari suatu sampel.<sup>36</sup> Pada penelitian ini aktivitas sitostatik senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun sungkai yang digunakan tergolong kuat karena memiliki nilai IC50 sebesar 55,08 µg/mL. Hal ini membuktikan sekaligus mendukung penelitian sebelumnya oleh Ibrahim et.al (2021 dan 2022) bahwa ekstrak etanol daun sungkai mampu menurunkan ekspresi gen TNF-α pada sel HeLa, terutama pada konsentrasi IC50 dan IC75, sehingga memperkuat bukti bahwa daun sungkai memiliki aktivitas antiinflamasi dan antikanker meskipun aktivitasnya lebih kuat dengan konsentrasi yang lebih tinggi (IC75).

#### IV. KESIMPULAN DAN SARAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sungkai berperan sebagai antiinflamasi dan antikanker melalui jalur pensinyalan TNF-α pada sel HeLa. Penelitian lanjutan disarankan untuk menentukan dosis optimal ekstrak etanol daun sungkai terhadap kanker serviks secara *in vitro* dan *in vivo*, menggunakan *real-time* PCR untuk hasil yang lebih akurat, serta melanjutkan ke uji klinis guna mendukung pengembangan terapi berbasis tanaman tradisional.

#### V. UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih kepada Dr. Gusti Revilla M.Kes dan dr. Husnil Kadri, M.Kes yang telah membimbing penulis.

#### DAFTAR PUSTAKA

- [1]. Brown JS, Amend SR, Austin RH, Gatenby RA, Hammarlund EU, Pienta KJ. Updating the definition of cancer. *Mol Cancer Res.* 2023;21(11):1142–7.
- [2]. World Health Organization (WHO). Cervical cancer. America: World Health Organization (WHO). 2018. (diakses 18 September 2022). Tersedia dari: [https://www.who.int/health-topics/cervical-cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cervical-cancer#tab=tab_1)
- [3]. Global Burden of Cancer (Globocan). Cancer incident in Indonesia. Switzerland: Int Agency Res Cancer. 2020. (diakses 18 September 2022). Tersedia dari: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/360-indonesia-fact-sheets.pdf>
- [4]. Dinas Kesehatan Provinsi Sumatera Barat. Profil dinas kesehatan Sumatera Barat tahun 2020. Padang: Germas. 2020. (diakses 19 Oktober 2022). Tersedia dari: [www.dinkes.sumbarprov.go.id](http://www.dinkes.sumbarprov.go.id)
- [5]. Kashyap N, Krishnan N, Kaur S, Ghai S. Risk factors of cervical cancer. *Asia-Pacific J Oncol Nurs.* 2019;6(3):308–14.
- [6]. Bedell SL, Goldstein LS, Goldstein AR, Goldstein AT. Cervical cancer screening: past, present, and future. *Sex Med Rev.* 2020;8(1):28–37.
- [7]. Kontostathi G, Zoidakis J, Makridakis M, Lygirou V, Mermelekas G, Papadopoulos T, et al. Cervical cancer cell line secretome highlights the roles of transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3, peroxiredoxin-2, and NRF2 on cervical carcinogenesis. *Biomed Res Int.* 2017;2:1–15.
- [8]. Fernandes JV, Fernandes TAADM, de Azevedo JCV, Cobucci RNO, de Carvalho MGF, Andrade VS, et al. Link between chronic inflammation and human papillomavirus-induced carcinogenesis. *Oncol Lett.* 2015;9(3):1015–26.
- [9]. Li J, Zhang Y, Chen L, Lu X, Li Z, Xue Y, et al. Cervical cancer hela cell autocrine apoptosis induced by coimmobilized IFN-γ plus TNF-α biomaterials. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018;10(10):2–38.
- [10]. Deivendran S, Marzook KH, Pillai MR. The role of inflammation in cervical cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2014;816:377–99.
- [11]. American Cancer Society. Treating cervical cancer. *J Gynecol Womens Heal.* 2021;2:4–16.
- [12]. American Cancer Society. Treating cervical

- cancer. 2024;1–33.
- [13]. World Health Organization (WHO). Comprehensive cervical cancer control. Geneva. 2014;2:366–78.
- [14]. Latief M, Anggun, Fisesa T, Putri, Sari M, Indra, et al. Aktivitas antiinflamasi ekstrak etanol daun sungkai (*Peronema canescens* Jack) pada mencit terinduksi karagenan. Vol. 7, Jurnal Farmasi Sains dan Praktis. 2021.
- [15]. Yin SY, Wei WC, Jian FY, Yang NS. Therapeutic applications of herbal medicines for cancer patients. Evidence-based Complement Altern Med. 2013;2013:5–6.
- [16]. Rupasinghe V. Antidiabetic activity of sungkai (*Peronema canescens* Jack) leaves ethanol extract on the male mice induced alloxan monohydrate. Artic Pharmacol Clin Pharm Res. 2021;6:64–71.
- [17]. Ibrahim A, Siswandono S, Wardoyo BPE. Potential anticancer activities of chloroform subfraction from *Peronema* leaf on colon cancer HT-29 cells in vitro. J Appl Pharm Sci. 2021;11(12):082–9.
- [18]. Nurjannah S, Arum D, Tarigan IL, Latief M. Anti-inflammatory prediction of peronemin compounds from Sungkai (*Peronema canescens* Jack) and their derivatives. Al Ulum J Sains Dan Teknol. 2023;9(2):59.
- [19]. Ibrahim A, Siswandono, Bambang Prajogo EW. Cytotoxic activity of *Peronema canescens* Jack leaves on human cells: HT-29 and primary adenocarcinoma colon cancer. Pharmacogn J. 2021;13(6):1389–96.
- [20]. Rahardhian MRR, Susilawati Y, Sumiwi A, Muktiwardoyo M, Muchtaridi. A review of Sungkai (*Peronema canescens*): Traditional usage, phytoconstituent, and pharmacological activities. Int J Appl Pharm. 2022;14(Special issue 5):15–23.
- [21]. Fikriansyah M, Nelson N, Latief M, Tarigan IL. Anticancer activities of seven Peronemins (A2, A3, B1, B2, B3, C1, and D1) from *Peronema canescens* Jack: A prediction studies. Chempublish J. 2023;7(1):54–63.
- [22]. Mahendika D, Darnez L. Pengaruh pemberian ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap gen anti apoptosis Bcl-2 continuous cell T47D pada kanker payudara. J Perspekt. 2021;20(2):1–9.
- [23]. Atzeni F, Puttini IPS. Tumor necrosis factor. Brenner's Encycl Genet Second Ed. 2013;7:229–31.
- [24]. Chu WM. Tumor necrosis factor. Cancer Lett. 2013;328:222–5.
- [25]. Das CR, Tiwari D, Dongre A, Khan MA, Husain SA, Sarma A, et al. Deregulated TNF-Alpha levels along with HPV genotype 16 infection are associated with pathogenesis of cervical neoplasia in northeast indian patients. Viral Immunol. 2018;31(4):282–91.
- [26]. Kallioli GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. Nat Rev Rheumatol. 2016;12(1):49–62.
- [27]. Hemmat N, Bannazadeh Baghi H. Association of human papillomavirus infection and inflammation in cervical cancer. Pathog Dis. 2019;77(5).
- [28]. Hong HS, Akhavan J, Lee SH, Kim RH, Kang MK, Park NH, et al. Proinflammatory cytokine TNF $\alpha$  promotes HPV associated oral carcinogenesis by increasing cancer stemness .pdf. Int J Oral Sci. 2020;12(3):1–7.
- [29]. Dista R, Larasati C, Ayuningsih S, Anggraeni N, Batubara I. Formulation and characterization of sungkai leaf extract nanoemulsion. Al-Kimia. 2022;10(2):192–200.
- [30]. Martínez G, Mijares MR, De Sanctis JB. Effects of Flavonoids and Its Derivatives on Immune Cell Responses. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov. 2019;13(2):84–104.
- [31]. Mondal A, Gandhi A, Fimognari C, Atanasov AG, Bishayee A. Alkaloids for cancer prevention and therapy: Current progress and future perspective. Eur J Pharmacol. 2019;8:5–24.
- [32]. Santiago LÂM, Neto RNM, Santos Ataíde AC, Fonseca DCSC, Soares EFA, de Sá Sousa JC, et al. Flavonoids, alkaloids and saponins: are these plant-derived compounds an alternative to the treatment of rheumatoid arthritis? A literature review. Clin Phytoscience. 2021;7(1):1–10.
- [33]. Ibrahim A, Siswandono S, Ew BP. Anticancer activity of *Peronema canescens* Jack leaves extracts against human cells : HT-29 and HeLa in vitro. Res J Pharm Tech. 2022;15(January):4739–44.
- [34]. Śliwka L, Wiktorska K, Suchocki P, Milczarek M, Mielczarek S, Lubelska K, et al. The comparison of MTT and CVS assays for the assessment of anticancer agent interactions. PLoS One. 2016;11(5):1–17.
- [35]. Gautam G. General principles of MTT assay method. Phytopharm Rev Isol Charact beta-sitosterol from leaves *Carica papaya*. 2018:4–6.
- [36]. Nurani LH, Mahfudh N, Gandjar IG, Rahayu I. Cytotoxic potential of *Arthrospira platensis* extract on cervical cancer cells line hela: Study on antiproliferative, cell cycle, apoptosis induction and anti metastasis. Indones J Pharm. 2020;31(1):19–26.
- [37]. Anggraini, D. (2019). Laboratory Examination in Hepatocellular Carcinoma. Health and Medical Journal, 1(2), 50-53.