

**UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK HERBA KELAKAI (*Stenochlaena palustris* (Burm.F.) Bedd.) TERHADAP SEL KANKER HATI HEPG2****Cytotoxic Activity of Herbaceous Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F.) Bedd.) against HepG2 Liver Cancer Cells****Masyitah Novia Yanti, Ismi Rahmawati*, Wiwin Herdwiani**

Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi, Jl. Let. Jend. Sutoyo, Jebres, Surakarta, Jawa Tengah 57127, Indonesia

*E-mail: ismirahmawati@setiabudi.ac.id.**ABSTRACT**

Liver cancer is a disease with a high number of cases. Kelakai herb (*Stenochlaena palustris* (Burm.f.) Bedd.) has cytotoxic activity against MCF-7, MDA-MB-231, DU-145 and HeLa cells. The aim of this study was to determine the cytotoxic activity of the herbal fraction of kelakai against HepG2 liver cancer cells. Kelakai herb was macerated using ethanol 96% followed by fractionation using n-hexane, ethyl acetate, and water as solvent. Cytotoxic test of the kelakai extracts and fractions were undertaken using the 3-[4,5-dimethylthiazol-2yl] 2,5-difeniltetrazolium bromide (MTT) assay method. Immunocytochemical reactions were applied to determine the expression of p53 and caspase-3 proteins in the apoptotic pathway of HepG2 cells. The results showed that the extract, n-hexane, and ethyl acetate fraction of kelakai herbs had cytotoxic activity against HepG2 cells, while the water fraction had no cytotoxic activity. Ethyl acetate fraction as the most active fraction of kelakai herbs could increase the expression of caspase-3 and p53 proteins in HepG2 cells. The ethyl acetate fraction had flavonoids, alkaloids, and tannins which are potent as a cytotoxic against HepG2 cells.

Keywords: Caspase-3, HepG2, herbaceous kelakai, liver cancer cells, p53**ABSTRAK**

Kanker hati merupakan salah satu penyakit dengan jumlah kasus yang cukup tinggi. Herba kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f.) Bedd.) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel MCF-7, MDA-MB-231, DU-145, dan HeLa. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik dari fraksi herba kelakai terhadap sel kanker hati HepG2. Herba kelakai dimaserasi dengan etanol 96%, dilanjutkan fraksinasi menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, dan air. Uji sitotoksik ekstrak dan fraksi herba kelakai dilakukan menggunakan metode 3-[4,5-dimetilthiazol-2yl] 2,5-difeniltetrazolium bromide (MTT assay). Reaksi immunositokimia digunakan untuk mengetahui ekspresi protein p53 dan caspase-3 pada jalur apoptosis sel HepG2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak, fraksi n-heksan, dan etil asetat herba kelakai memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel HepG2, sedangkan fraksi air tidak memiliki aktivitas sitotoksik. Fraksi etil asetat sebagai fraksi teraktif dari herba kelakai dapat meningkatkan ekspresi protein caspase-3 dan p53 pada sel HepG2. Fraksi etil asetat memiliki golongan senyawa flavonoid, alkaloid, dan tanin yang memiliki kemampuan sitotoksik terhadap sel HepG2.

Kata Kunci: Caspase-3, HepG2, herba kelakai, p53, sel kanker hati

PENDAHULUAN

Penyakit kanker merupakan salah satu penyakit yang mematikan pada manusia. Tahun 2020 terdapat kematian hampir 10 juta jiwa akibat dari kanker. Angka kejadian kanker akan terus meningkat setiap tahun dengan adanya penambahan penduduk. Kasus kanker hati pada tahun 2020 tercatat 830.000 kasus yang menyebabkan kematian (WHO 2021). *Hepatocellular carcinoma* (HCC) merupakan tumor ganas primer pada sel hepatosit (*liver epithelial cells*) dengan prognosis mengakibatkan kematian pada manusia cukup tinggi. Penderita HCC sekitar 70–90% memiliki riwayat penyakit hepatitis kronik dan sirosis yang dapat disebabkan oleh virus hepatitis C, infeksi virus hepatitis B, mengkonsumsi alkohol secara berlebihan, dan *non-alcoholic steatohepatitis* (NASH) (Sia et al. 2017, Apriyanto et al. 2018).

Kanker umumnya dapat dikarakterisasi dengan adanya mutasi pada gen penyebab kanker. Protein p53 dan caspase-3 banyak ditemukan pada sel-sel kanker. Secara normal, protein ini berperan dalam menjaga keseimbangan fisiologis antara proliferasi, apoptosis dan diferensiasi (Sari 2018).

Penderita kanker hati umumnya dapat dikarakterisasi dengan adanya mutasi pada gen penyebab kanker. Gen p53 dan caspase-3 merupakan dua gen yang banyak ditemukan pada sel-sel kanker. Gen p53 pada kondisi normal akan mengontrol siklus sel dan replikasi DNA (Wong 2011). Saat terjadi kerusakan DNA, p53 akan menahan sel untuk memasuki fase berikutnya dan memberikan waktu pada DNA untuk melakukan perbaikan. Bila kerusakan cukup parah, p53 akan menginisiasi terjadinya apoptosis sel (Sari 2018). Mekanisme aktivasi p53 tergantung pada sifat alami sinyal stres. Stres protein seluler akan mengaktifkan *wild type* p53 yang akan berfungsi sebagai pengatur protein yang memicu perubahan respons biologis sel. Aktivasi p53 tersebut akan menyebabkan pengaktifan gen target p53 sebagai contoh: respons kerusakan DNA akan menyebabkan putusannya rantai ganda DNA, ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) protein kinase yang akan mengaktifkan Chk2 kinase. ATM dan Chk2 bersama-sama akan memfosforilasi p53 yang menyebabkan berhentinya siklus sel atau apoptosis (Prakosa et al. 2013, Sari

2018). Caspase-3 merupakan caspase eksekutor, aktivasi dari sekuensial caspase berperan penting pada fase eksekusi dari apoptosis sel. Aktivasi caspase memacu fragmentasi DNA dan digesti protein sel yang menyebabkan gangguan integritas sel, diikuti pengkerutan sel, kondensasi kromatin, *membrane blebbing*, dan pembentukan badan apoptosis yang kemudian akan didigesti oleh sel fagosit (Gimenez-Bonafe et al. 2009).

Banyak obat kanker yang memiliki efek resisten terhadap suatu gen dan efek samping yang besar terhadap tubuh, sehingga belakangan ini banyak dilakukan pengembangan obat yang berasal dari bahan alam. Salah satu herba yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen pengobatan herbal adalah herba kelakai. Herba kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f.) Bedd.) merupakan tumbuhan khas rawa yang tumbuh di Kalimantan Selatan (Syamsul et al. 2019).

Herba kelakai memiliki aktivitas antikolinergik (Chear et al. 2016), antibakteri (Rostinawati et al. 2018), antilarva *Aedes aegypti* (Suling et al. 2020), antioksidan (Chai et al. 2015, Arullappan et al. 2017, Nurhasnawati et al. 2019), antitumor (Margono et al. 2016), sitotoksik terhadap sel kanker payudara (MCF-7 dan MDA-MB-231) dan prostat (DU-145). Penelitian Arullappan et al. (2017) menyatakan bahwa fraksi terisolasi dari daun kelakai terhadap sel kanker HeLa memiliki aktivitas sitotoksik dengan nilai IC₅₀ kurang dari 50%. Herba kelakai memiliki kandungan metabolit sekunder yaitu alkaloid, saponin, flavonoid, fenol, terpenoid, glikosida dan tanin (Chear et al. 2016, Pratiwi et al. 2016, Suryadini 2019, Syamsul et al. 2019). Kandungan metabolit sekunder didapatkan dari ekstraksi yang dilanjutkan dengan fraksinasi untuk pengelompokan suatu senyawa berdasarkan kepolaran. Flavonoid diketahui memiliki aktivitas menghambat proliferasi pada berbagai sel kanker maupun apoptosis. Alkaloid digunakan sebagai antitumor dan mampu menginduksi apoptosis (Chear et al. 2019).

Berdasarkan studi-studi yang telah dilakukan di atas, herba kelakai memiliki senyawa dengan aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker dan potensi untuk dikembangkan sebagai antikanker hepar. Penelitian ini

bertujuan untuk membuktikan ekstrak dan fraksi herba kelakai memiliki aktivitas sitotoksik dan melihat pengaruh jumlah protein p53 dan caspase-3 terhadap sel kanker hati HepG2.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Ekstraksi dan fraksinasi herba kelakai dilakukan di Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta. Pengujian efek sitotoksik dengan metode MTT-assay, imunositokimia protein p53 dan caspase 3 yang dilakukan di Laboratorium Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Waktu penelitian dari November 2019–Februari 2020.

Alat dan bahan

Alat yang digunakan adalah ayakan *mesh* 40, oven, *moisture balance*, kertas saring, evaporator, neraca analitik, tabung reaksi, *sentrifuge* Sigma 3K12 (B. Braun Biotech Internasional), inkubator 37 °C aliran CO₂ 5% model 6200 (Napco), *Laminar air flow class II* (Labconco), neraca elektrik (Sartorius), spektrokolorimeter pada alat ELISA reader (SLT 240 ATC), *Neubauer haemocytometer* (Olympus CKX41), autoklaf, tabung konikal steril (Nunclone), *tissue culture flask* (Nunclone), mikropate 96 dan 24 sumuran (Nunclone), mikropipet 20–200 µL dan 200–1000 µL (Pipetman), mesin vortex, conical tube 15 mL, *magnetic stirrer* dan mikroskop inverted (Axiovert-25).

Bahan yang digunakan adalah herba kelakai yang telah dilakukan determinasi di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA, Universitas Sebelas Maret Surakarta, etanol 96%, n-heksan, etil asetat, air, lempeng KLT silika gel GF₂₅₄, pereaksi Liebermann-Burchard, pereaksi sitroborat 1%, pereaksi Dragendorff, pereaksi asam sulfat anhidrat, pereaksi FeCl₃, sel kanker hati HepG2, sel normal vero, media DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium*), media M199, kontrol positif (cisplatin), Natrium bikarbonat, HEPES (Sigma), NaOH 1M, HCl 1M, *aquadest*, *fetal bovine serum* (FBS) 10% v/v (Gibco), Fungizon (Amphoteterisin B) 0,5% v/v (Gibco), Penisillin-Streptomisin 2% v/v (Gibco), Dimetil sulfoksida (DMSO), Tripsin 0,5%, MTT, larutan *phosphate buffered saline* (PBS) pH 7,2. sodium dodesil sulfat (SDS) 10% dalam HCl 0,1 N, metanol, (*blocking*

serum) hidrogen peroksida, *prediluted blocking serum*, antibodi primer untuk antigen caspase-3 dan p53, *xylol*, *mouting media* dan *novostatin universal detection kit*.

Pembuatan ekstrak dan fraksi

Herba kelakai yang sudah kering, digiling, diayak dengan *mesh* 40. Serbuk kering diekstraksi menggunakan etanol 96% dengan cara dimaserasi (perbandingan 1:10) pada suhu kamar selama 5 hari. Seluruh ekstrak dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* (Darma et al. 2011). Pembuatan fraksi dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan alat corong pisah. Fraksinasi dilakukan berturut-turut dengan pelarut air, n-heksan dan etil asetat. Fraksinasi dilakukan hingga warna pelarut jernih dan diperoleh fraksi n-heksan, etil asetat dan fraksi air. Hasil dari fraksinasi dipekatkan dengan *rotary evaporator* (Uthia et al. 2017).

Identifikasi kandungan senyawa sitotoksik

Identifikasi flavonoid, menggunakan fase diam lempeng KLT (kromatografi lapis tipis) silika gel GF₂₅₄ dengan eluen n-heksan : etil asetat : asam formiat (6:4:0,2). Perbandingan yang digunakan yaitu kaempferol. Hasil KLT dideteksi dengan menggunakan pereaksi semprot sitroborat. Hasil positif menunjukkan warna kuning atau orange pada sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm (Nurmilatina 2017).

Identifikasi alkaloid, menggunakan fase diam lempeng KLT silika gel GF₂₅₄ dengan eluen etil asetat : metanol : air (90:9:1). Perbandingan yang digunakan kafein. Hasil KLT dideteksi dengan menggunakan pereaksi Dragendorff. Hasil positif menunjukkan warna jingga pada sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm (Nurmilatina 2017).

Identifikasi saponin, menggunakan fase diam lempeng KLT silika gel GF₂₅₄ dengan eluen kloroform : metanol : air (60:30:10). Hasil KLT dideteksi dengan menggunakan pereaksi anisaldehyd asam sulfat pekat, dipanaskan pada suhu 110 °C selama 5–10 menit. Hasil positif menunjukkan warna biru atau biru violet, kadang kekuningan (Pratiwi et al. 2016, Nurmilatina 2017).

Identifikasi tanin, menggunakan fase diam lempeng KLT silika gel GF₂₅₄ dengan eluen toluena : etil asetat (3:1). Hasil KLT

dideteksi pereaksi semprot ferri sulfat. Hasil positif menunjukkan warna biru kehitaman menandakan tanin galat dan berwarna hijau kehitaman menandakan tanin katekol pada sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm (Nurmilatina 2017, Suryadini 2019).

Identifikasi triterpenoid, menggunakan fase diam lempeng KLT silika gel GF₂₅₄ dengan eluen n-heksanetil : asetat (7:3). Perbandingan yang digunakan stigmasterol. Hasil KLT dideteksi dengan menggunakan pereaksi semprot Liebermann-Burchard. Hasil positif menunjukkan warna biru keunguan sampai kecoklatan pada sinar UV dengan panjang gelombang 254 dan 366 nm (Nurmilatina 2017).

Pembuatan suspensi dan penghitungan sel

Sel HepG2 dan sel vero aktif dalam PBS disentrifugasi dengan kecepatan 1.200 rpm selama 10 menit. Endapan yang terbentuk ditambah media penumbuh DMEM untuk sel HepG2 dan media M₁₉₉ untuk sel vero. Sel diinkubasi 37 °C selama 24 jam. Setelah 24 jam, dilakukan pemisahan antara sel dan medium dengan disentrifugasi. Sel diamati di bawah mikroskop untuk memperkirakan jumlah sel mencapai konfluen (70–80%). Sel yang telah konfluen dilakukan pemanenan. Pemanenan dengan cara sel dicuci dengan PBS 2 kali, ditambahkan 1 mL tripsin lalu diinkubasi selama 3–5 menit. Hasil diamati pelepasan sel dari dasar *plate* dengan mikroskop. Sel dalam *conical* steril ditambah media penumbuh sebanyak 2 mL untuk menghentikan kerja tripsin. Media sebanyak 10 mL ditambahkan dan disentrifugasi dengan kecepatan 1.500 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, endapan ditambahkan 3 mL media dan diresuspensikan. Terakhir diambil 10 µL dan dipipetkan ke hemositometer, kemudian sel dihitung di bawah mikroskop *inverted* (CCRC 2009a).

Uji sitotoksisitas dan indeks selektivitas

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode MTT (3-[4,5-dimetilthiazol-2-yl] 2,5-difeniltetrazolium bromide). Larutan uji 100 µL dengan konsentrasi 500; 250; 125; 62,5; dan 31,2 µg mL⁻¹ disuspensikan dengan 100 µL dalam media penumbuh DMEM untuk sel HepG2 sedangkan M199 untuk sel vero kemudian

dimasukkan ke dalam *microplate* 96 sumuran. Sel diinkubasi pada inkubator CO₂ 5% pada suhu 37 °C selama 24 jam. Akhir inkubasi medium dibuang, dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali, kemudian ditambahkan 100 µL MTT 0,3% ke dalam *microplate* 96 sumuran dan diinkubasikan kembali selama 4 jam. Sel hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formazan berwarna ungu dan untuk menghentikan reaksi antara sel dengan MTT serta melarutkan formazan maka ditambahkan 100 µL SDS 10% dalam 0,1 N HCl. *Plate* kemudian dibungkus dengan kertas aluminium foil, diinkubasi 24 jam pada suhu kamar. Serapan dibaca dengan menggunakan spektrofotometer pada alat ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm kemudian diperoleh data absorbansi yang dikonversikan dalam persen viabilitas dan dihitung nilai IC₅₀ (Istiqomah et al. 2015, CCRC 2019b).

Nilai IC₅₀ dihitung menggunakan persamaan regresi linier yang menggambarkan hubungan antara persentase viabilitas sel HepG2 dan sel normal dengan log konsentrasi sampel uji yaitu $y = a + bx$. Nilai y menggambarkan persen viabilitas, nilai x menggambarkan log konsentrasi senyawa, dan nilai IC₅₀ menggambarkan antilog x . Rentang nilai IC₅₀ bila $<50 \mu\text{g mL}^{-1}$ memiliki efek sitotoksik yang sangat kuat, $50 > \text{IC}_{50} < 200 \mu\text{g mL}^{-1}$ memiliki efek sitotoksik sedang dan $200 > \text{IC}_{50} < 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ memiliki efek sitotoksik lemah. Nilai IC₅₀ $> 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ dinyatakan tidak memiliki aktivitas sitotoksik (Fatmawati 2018). Indeks selektivitas (SI) diperoleh dari nilai IC₅₀ sel HepG2 dibandingkan dengan nilai IC₅₀ sel normal. Ekstrak dan fraksi dinyatakan selektif bila nilai SI ≥ 3 , dan dikatakan kurang selektif bila nilai SI ≤ 3 (Sirait dan Setyaningsih 2019).

Uji imunositokimia

Sel HepG2 dengan kepadatan 5×10^4 sel/sumuran ditanam di atas *cover slips* sampai konfluen 80%. Sampel dengan konsentrasi 2x nilai IC₅₀; 1x nilai IC₅₀; ½ x nilai IC₅₀, media kultur dan kontrol positif (cisplatin) sebanyak 1000 µL dimasukkan ke dalam *microplate* 96 sumuran dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Sel difiksasi dengan metanol kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 4 °C dan dicuci dengan PBS 1 kali. Letakkan *cover slips* ke dalam sumuran 6 *well plate* yang bersih dan diberi label.

Sel ditetaskan 3–4 tetes larutan hidrogen peroksida (*blocking solution*) pada suhu ruang dan ditambahkan *prediluted blocking serum (background sniper)* diinkubasi selama 10 menit dan dibuang, ditambah sebanyak 100 μL secara berurut antibodi monoklonal primer untuk antigen p53 dan caspase-3, antibodi sekunder kemudian dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali, ditambahkan 100 μL reagen *streptavidin-enzim peroksidase* diinkubasi selama 30 menit dan dicuci dengan PBS 2 kali 100 μL ditambahkan larutan substrat kromogen DAB (3,3'-diaminobenzidine) diinkubasi 10 menit dan dicuci dengan aquades, ditambahkan 100 μL larutan Mayer's haematoxylin dan dicuci dengan aquadest. *Cover slip* ditetaskan 2–3 tetes *xylo* kemudian dikeringkan dan ditetaskan sebanyak 2–3 tetes larutan alkohol. *Cover slip* diletakkan di atas *object glass*, ditetesi lem (*mounting media*) dan ditutup dengan *cover slip* kotak. Ekspresi protein diamati dengan mikroskop. Sel yang mengekspresikan protein p53 dan caspase-3 akan memberikan warna coklat/gelap, sedangkan tidak mengekspresikan protein p53 dan caspase-3 akan memberikan warna ungu/ biru (CCRC 2009a).

Analisis data

Data yang diperoleh dilakukan perhitungan persentase sel yang terekspresi secara kuantitatif menggunakan aplikasi *software image J* versi Java 1.8.0_40 (64-bit) dengan pengamatan 1 lapang pandang 3 kali replikasi. Analisis data nilai IC_{50} tiap perlakuan dan data kuantitatif ekspresi protein p53 dan caspase-3 diuji dengan statistik *SPSS 21*. Uji statistik dengan

menggunakan uji *one way ANOVA* dilanjutkan dengan uji *Post Hoc test* dengan perbedaan bermakna pada nilai sig. $p < 0,05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil ekstraksi herba kelakai dengan etanol 96% didapatkan ekstrak kental dengan rendemen sebesar 5,30% dari berat serbuk kering sebesar 1000 g dan berat ekstrak 53 g. Hasil ekstrak difraksinasi dengan pelarut n-heksan, etil asetat dan air dapat dilihat pada Tabel 1. Berdasarkan tabel, fraksi N-heksan memiliki rendemen yang lebih banyak. Hal ini mungkin disebabkan banyaknya senyawa sekunder yang bersifat non polar seperti alkaloid, terpenoid dan steroid yang tersari secara optimal.

Identifikasi kandungan kimia menggunakan metode KLT dilakukan pada ekstrak, fraksi n-heksan, etil asetat dan air terhadap golongan senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, tanin dan triterpenoid. Senyawa yang diidentifikasi merupakan senyawa yang memiliki aktivitas antikanker. Hasil identifikasi kandungan senyawa tersebut dapat dilihat pada Tabel 2, Gambar 1 dan 2.

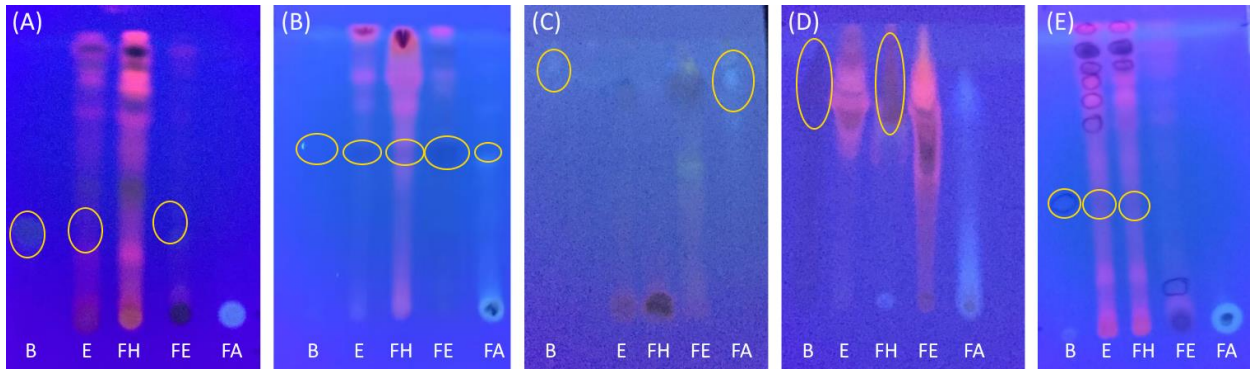
Hasil KLT menunjukkan bahwa ekstrak herba kelakai positif mengandung golongan senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, tanin dan triterpenoid. Sedangkan pada fraksi n-heksan, etil asetat dan air hanya memiliki beberapa dari kandungan kimia saja yang disari berdasarkan kepolarannya. Fraksi n-heksan memiliki sifat non polar sehingga golongan senyawa alkaloid yang bersifat non polar dan triterpenoid tersari ke dalam fraksi n-heksan. Fraksi etil asetat yang bersifat semi polar mensari golongan senyawa flavonoid,

Tabel 1. Hasil pembuatan fraksi herba kelakai

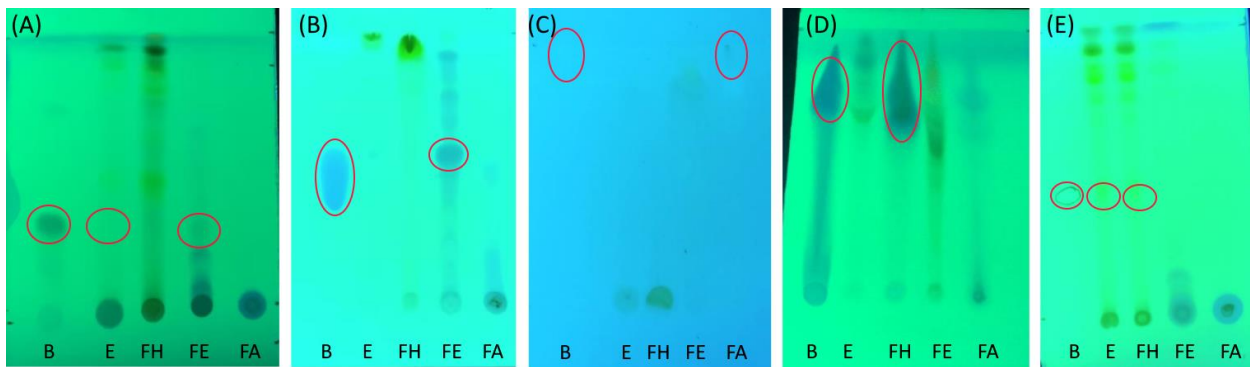
Sampel	Berat Ekstrak (g)	Berat Fraksi (g)	Rendemen (%)
Fraksi n-heksan	20	12,33	61,68
Fraksi etil asetat	20	1,46	7,29
Fraksi air	20	4,10	20,49

Tabel 2. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak herba kelakai

Uji	Flavonoid	Alkaloid	Saponin	Tanin	Triterpenoid
Ekstrak	+	+	+	+	+
Fraksi n-heksan	-	+	-	-	+
Fraksi etil asetat	+	+	-	+	-
Fraksi air	-	+	+	-	-



Gambar 1. Hasil identifikasi senyawa pada UV 366: (A) Flavonoid; (B) Alkaloid; (C) Saponin; (D) Tanin; dan (E) Triterpenoid. (B: Baku, E: Ekstrak, FH: Fraksi n-heksan, FE: Fraksi etil asetat, dan FA: Fraksi air)

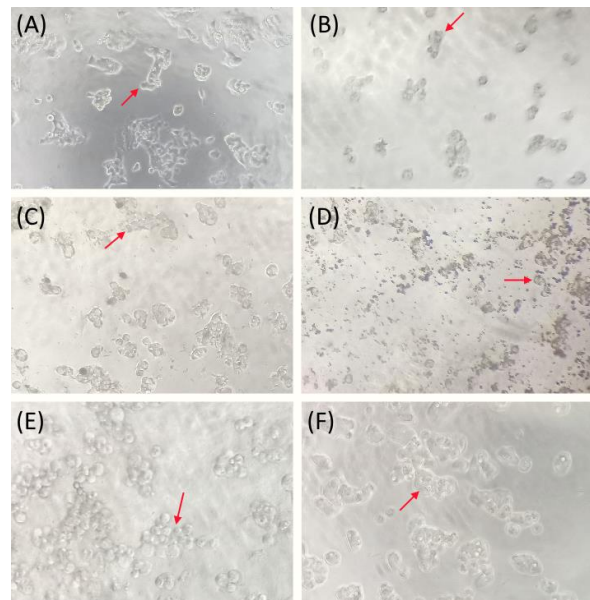


Gambar 2. Hasil identifikasi senyawa pada UV 256: (A) Flavonoid; (B) Alkaloid; (C) Saponin; (D) Tanin; dan (E) Triterpenoid. (B: Baku, E: Ekstrak, FH: Fraksi n-heksan, FE: Fraksi etil asetat, dan FA: Fraksi air)

alkaloid, dan tanin yang bersifat semi polar. Fraksi air yang memiliki sifat polar menarik golongan senyawa alkaloid dan saponin yang bersifat polar.

Hasil perhitungan jumlah sel kanker HepG2 yang hidup dalam stok suspensi sel adalah 88×10^4 sel mL^{-1} dan pada sel vero, sel kanker yang hidup dalam stok suspensi adalah sel vero 155×10^4 sel mL^{-1} . Uji sitotoksik dilakukan dengan seri konsentrasi ekstrak dan fraksi sebesar 500; 250; 125; 62,5; 31,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ menggunakan pelarut DMSO 0,1%. Pelarut DMSO merupakan pelarut senyawa polar maupun non polar dan tidak bersifat toksik serta tidak memberikan aktivitas apapun. Hasil uji sitotoksik ekstrak dan fraksi herba kelakai dapat diamati melalui pengamatan morfologi sel yang dapat dilihat pada Gambar 3, dimana sel mengalami pengkerutan, kondensasi kromatin, plasma membran mengalami abnormal dan sel menjadi sirkuler (Yu et al. 2013).

Aktivitas uji sitotoksik ekstrak dan fraksi herba kelakai menunjukkan *dose dependent*, yaitu viabilitas sel berkurang



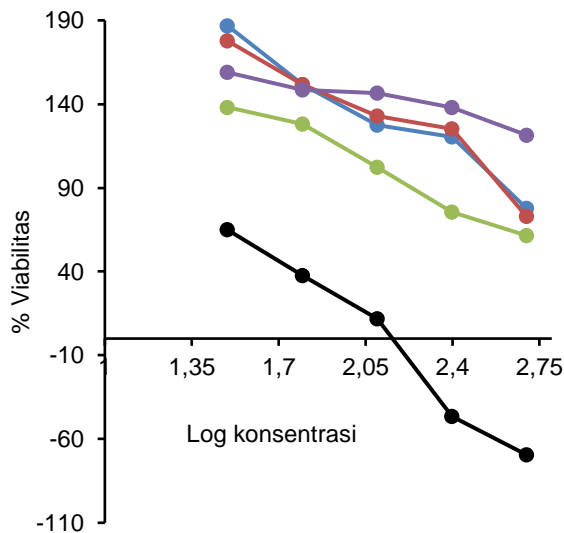
Gambar 3. Morfologi sel HepG2 dengan ekstrak dan fraksi herba kelakai: (A) Sel kontrol kanker HepG2; (B) Kontrol positif (cisplatin); (C) ekstrak konsentrasi 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (D) Fraksi n-heksana konsentrasi 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (E) Fraksi etil asetat konsentrasi 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (F) Fraksi air konsentrasi 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (perbesaran 400x)

seiring bertambahnya konsentrasi ekstrak dan fraksi herba kelakai. Hasil % viabilitas dilihat pada Gambar 4 dan 5. Hasil nilai IC₅₀ yang paling rendah terdapat pada fraksi etil asetat dengan rata-rata nilai IC₅₀ sebesar 224,12 µg mL⁻¹ sedangkan nilai IC₅₀ kontrol positif (cisplatin) sebesar 28,63 µg mL⁻¹ dengan nilai r semua sampel >0,9. Nilai IC₅₀ kurang 50 µg mL⁻¹ memiliki efek sitotoksik yang sangat kuat, nilai IC₅₀ 50–200 µg mL⁻¹ memiliki efek sitotoksik sedang, nilai IC₅₀ 200–1000 µg mL⁻¹ memiliki efek sitotoksik lemah dan nilai IC₅₀ lebih 1000 µg mL⁻¹ dinyatakan tidak memiliki aktivitas sitotoksik (Fatmawati et al. 2018). Berdasarkan dari kriteria tersebut dapat disimpulkan bahwa ekstrak dan fraksi n-heksan herba kelakai pada penelitian ini menunjukkan aktivitas sitotoksik yang lemah terhadap sel kanker HepG2 sedangkan fraksi air tidak memiliki aktivitas sitotoksik.

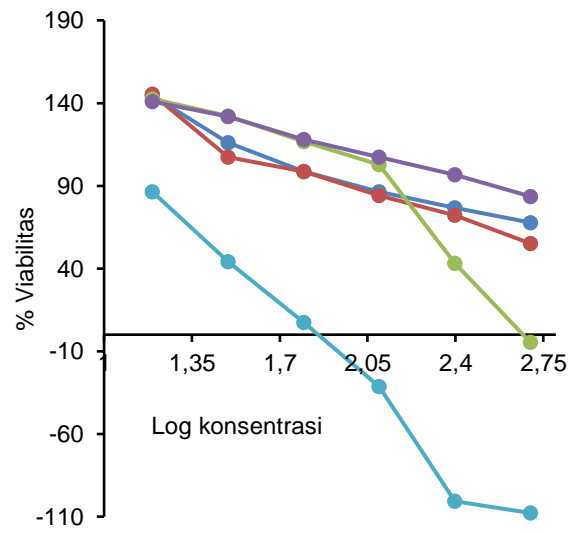
Ekstrak dan fraksi yang memiliki sifat sitotoksik terhadap sel kanker juga harus memiliki nilai indeks selektivitas yang

menunjukkan tingkat keamanan atau selektivitas sitotoksik dari ekstrak dan fraksi herba kelakai terhadap sel kanker dan sel normal. Ekstrak dan fraksi dikatakan selektif bila mempunyai nilai indeks selektivitas ≥ 3 (Istiqomah et al. 2015, Mutiah et al. 2017). Hasil perhitungan indeks selektivitas ekstrak dan fraksi herba kelakai dapat dilihat pada Tabel 3. Nilai indeks selektivitas tersebut dapat dinyatakan bahwa fraksi etil asetat herba kelakai memiliki tingkat selektivitas yang tinggi dalam menghambat pertumbuhan sel, artinya fraksi etil asetat herba kelakai memiliki potensi sitotoksik terhadap sel kanker tetapi juga memiliki tingkat keamanan yang baik terhadap sel normal.

Nilai IC₅₀ ekstrak dan fraksi herba kelakai yang besar diduga karena berbagai faktor yang mempengaruhinya, seperti kompleksitas senyawa yang terkandung alkaloid, flavonoid, tanin, fenolik, saponin dan triterpenoid di dalam ekstrak dan fraksi tersebut dapat memungkinkan



Gambar 4. Viabilitas sel Hepg2 (—●— Ekstrak; —●— Fraksi n-heksan; —●— Fraksi etil asetat; —●— Fraksi air; —●— Kontrol positif (cisplatin))



Gambar 5. Viabilitas sel Vero (—●— Ekstrak; —●— Fraksi n-heksan; —●— Fraksi etil asetat; —●— Fraksi air; —●— Kontrol positif (cisplatin))

Tabel 3. Hasil perhitungan indeks selektivitas ekstrak dan fraksi herba kelakai

Sampel	IC ₅₀ (µg mL ⁻¹) Sel HepG2	IC ₅₀ (µg mL ⁻¹) Sel Vero	Nilai Indeks Selektivitas*
Ekstrak	865,84	1300,12	1,50
Fraksi n-heksan	568,38	1525,34	2,68
Fraksi etil asetat	224,12	704,03	3,14
Fraksi air	3950,28	265722,20	67,27
Kontrol positif (cisplatin)	28,63	46,44	1,62

Tabel 4. Hasil persentase ekspresi p53 dan caspase-3

Perlakuan	Konsentrasi $\mu\text{g mL}^{-1}$	Rata-rata Luas Area Ekspresi p53 (%) \pm SD	Rata-rata Luas Area Ekspresi Caspase-3 (%) \pm SD
Ekstrak	2 IC ₅₀ (1731,68)	2,19 \pm 0,20 ^a	2,78 \pm 0,97
	IC ₅₀ (865,84)	15,12 \pm 0,67 ^a	17,92 \pm 0,38 ^a
	1/2 IC ₅₀ (432,92)	8,44 \pm 0,74 ^a	9,98 \pm 0,48 ^a
Fraksi etil asetat	2 IC ₅₀ (112,06)	2,33 \pm 0,31 ^a	6,85 \pm 0,62 ^{ab}
	IC ₅₀ (224,12)	7,82 \pm 0,92 ^a	4,96 \pm 0,48 ^b
	1/2 IC ₅₀ (448,24)	6,26 \pm 0,57 ^{ab}	12,96 \pm 1,25 ^a
Kontrol positif (cisplatin)	28,63	4,11 \pm 0,40 ^b	3,31 \pm 0,43 ^b
Sel kontrol	–	5,18 \pm 0,39 ^a	5,88 \pm 0,32 ^a

Keterangan:

- Berbeda bermakna dengan kontrol positif ($p < 0,05$)
- Tidak terdapat perbedaan bermakna dengan sel kontrol ($p > 0,05$)

mempengaruhi aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker. Golongan senyawa alkaloid yang ditarik oleh fraksi n-heksan dan etil asetat diduga memiliki aktivitas antitumor dan mampu menginduksi apoptosis melalui ikatannya dengan DNA, topoisomerase I, dan penstabilan kompleks topoisomerase-DNA terpotong. Penstabilan kompleks pemotongan ini akan menyebabkan kerusakan pilinan ganda DNA yang permanen sehingga mengarah terjadinya apoptosis (Sari 2018). Golongan senyawa fenolik dan flavonoid yang ditarik fraksi etil asetat diduga memiliki aktivitas sitotoksik pada sel kanker hati HepG2 melalui penghambatan kinetika proliferasi dan induksi apoptosis melalui aktivasi caspase-3 tanpa meningkatkan ekspresi protein Bax. Golongan senyawa flavonoid pada herba kelakai menghambat aktivitas topoisomerase DNA I/II, membantu penurunan ROS (*reactive oxygen species*), regulasi ekspresi *heat shock protein*, modulasi jalur apoptosis, aktivasi caspase-9 dan caspase-3, penurunan ekspresi faktor transkripsi *nuclear factor kappaB* (NF-kappaB), aktivasi endonuklease, dan penurunan protein Mcl-1 (Mardiyaningsih dan Ismiyati 2014, Chear et al. 2016, Sari 2018). Golongan senyawa flavonoid yang ada di herba kelakai adalah kaempferol, katekin, antosianin dan 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4H-piranon yang memiliki aktivitas antikanker (Nurmilatina 2017). Fraksi etil asetat diduga mensari senyawa metabolit sekunder lebih banyak seperti golongan senyawa alkaloid, saponin, flavonoid, fenol, terpenoid, glikosida dan

tanin, sehingga nilai IC₅₀ dari persen viabilitas pada fraksi etil asetat lebih kecil dibanding fraksi n-heksan.

Fraksi air memiliki sifat polar, dimana kandungan senyawa yang tersari bersifat polar. Kandungan senyawa herba kelakai bersifat polar tidak memiliki aktivitas menghambat sel kanker. Hal ini diduga karena senyawa yang sulit menembus membran sel kanker yang bersifat non polar (hidrofobik). Sel kanker dan sel normal terdiri dari membran sel dengan penyusun berupa P-glikoprotein yang merupakan pelindung sel dan bersifat hidrofobik (non polar) sehingga obat yang masuk biasanya mengalami *bypassing* atau adanya *efflux* pengeluaran obat (Wong 2011).

Uji imunositokimia ini bertujuan untuk melihat aktivitas ekstrak dan fraksi herba kelakai terhadap ekspresi protein supresor yaitu p53 dan pro-apoptosis yaitu caspase-3, dimana protein ini memiliki peran penting dalam mekanisme regulasi sel untuk mengontrol program kematian sel (Moningka 2019). Pengujian ini dilakukan pada tiga kelompok perlakuan yaitu kelompok tanpa perlakuan (sel kontrol), kontrol positif (cisplatin), dan kelompok yang diberi ekstrak dan fraksi etil asetat dengan masing masing konsentrasi yaitu konsentrasi pada Tabel 4. Ekspresi p53 dan caspase-3 ditunjukkan dengan adanya ikatan antara protein dengan masing-masing antibodi monoklonal dan antibodi yang digunakan adalah antibodi p53 dan caspase-3 yang mendeteksi berupa warna coklat/gelap pada sitoplasma dan membrane sel (Prakosa et al. 2013, CCRC

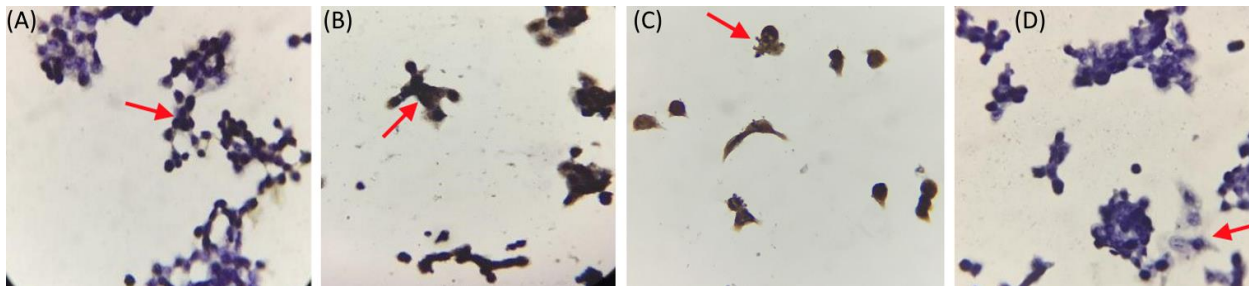
2019a). Hasil pengecatan imunositokimia sel HepG2 dapat dilihat ekspresi p53 dan caspase pada Gambar 6 dan 7.

Warna coklat yang dihasilkan oleh sel yang terekspresi akibat adanya perubahan warna dari reagen DAB oleh antibodi p53 dan caspase-3 yang diberikan kepada sel kanker, sedangkan warna ungu yang dihasilkan akibat adanya penambahan reagen *haematoxylin* sebagai *counterstain* untuk memudahkan pengamatan terhadap sel yang mengekspresi p53 dan caspase-3, sehingga sel yang tidak diberikan perlakuan seperti sel kontrol tidak menunjukkan warna coklat karena reagen DAB tidak bereaksi dengan antibodi sehingga sel hanya akan terwarnai oleh reagen *haematoxylin* yang berwarna ungu (CCRC 2009a).

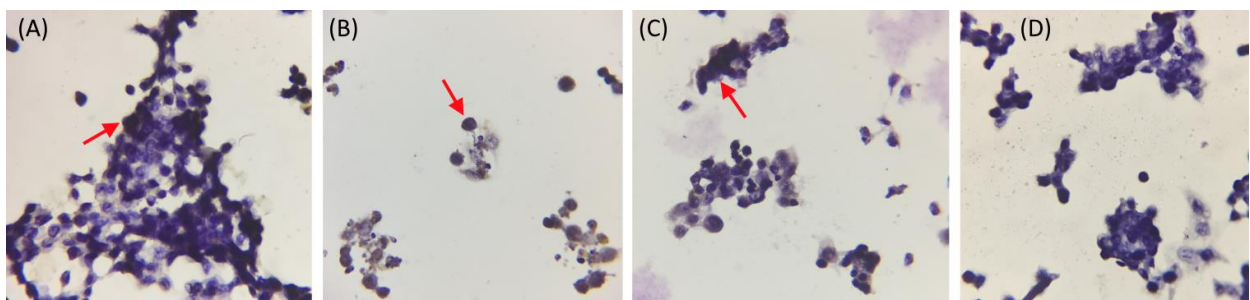
Hasil analisis data ekspresi protein menggunakan *software image J versi Java 1.8.0_40* (64-bit) dapat dilihat pada Tabel 4. Semakin besar konsentrasi menunjukkan semakin besar luas area yang terekspresi p53 dan caspase-3 pada sel kanker HepG2. Kelompok sel kontrol dengan pemberian antibodi p53 memiliki hasil persentase area terekspresi yang lebih kecil dibanding persen ekspresi yang diberi perlakuan. Hal ini dapat diartikan bahwa terjadinya peningkatan ekspresi protein p53. Hasil analisis statistik

menunjukkan ada perbedaan bermakna dengan nilai sig. $p < 0,05$ antara ekstrak herba kelakai dan kelompok sel kontrol positif dengan kelompok ekstrak. Fraksi etil asetat tidak ada perbedaan yang bermakna antar kelompok sel HepG2 dengan kontrol positif dan fraksi etil asetat herba kelakia $\frac{1}{2} IC_{50}$. Untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok konsentrasi perlakuan, maka dilakukan pengujian statistik pada p53 dan caspase-3. Jumlah protein pada p53 terjadi perbedaan bermakna dengan nilai sig. $p < 0,05$ secara statistik pada ekstrak herba kelakai terdapat antara kelompok sel kontrol positif dengan kelompok ekstrak $2 IC_{50}$, IC_{50} , $\frac{1}{2} IC_{50}$, fraksi etil asetat $2 IC_{50}$, IC_{50} , $\frac{1}{2} IC_{50}$.

Mekanisme sitotoksik ekstrak dan fraksi herba kelakai diduga adanya *cellular stress* yang membuat ekspresi protein p53 meningkat, sehingga mengakibatkan terjadinya fase *G1 arrest* (penghentian siklus sel) atau apoptosis. Anggota dari *apoptosis stimulating protein* p53 (ASPP), yaitu ASPP 1 dan ASPP 2 secara spesifik menstimulasi fungsi trans aktivasi p53 pada promotor gen proapoptotik seperti Bax dan p53 *inducible gene 3* (PIG 3), tapi tidak pada promotor gen yang menyebabkan *cell cycle arrest*, yaitu p21 dan MDM2. Aktivitas p53 akan



Gambar 6. Hasil pengecatan ekspresi protein caspase-3: (A) Konsentrasi ekstrak herba kelakai IC_{50} 865,84 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (B) Konsentrasi fraksi etil asetat herba kelakai IC_{50} 224,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (C) Kontrol positif (cisplastin); (D) Kontrol negatif (Perbesaran 400x)



Gambar 7. Hasil pengecatan ekspresi protein p53: (A) Konsentrasi ekstrak herba kelakai IC_{50} 865,84 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (B) Konsentrasi fraksi etil asetat herba kelakai IC_{50} 224,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (C) Kontrol positif (cisplastin); (D) Kontrol negatif (Perbesaran 400x)

mempertahankan sel pada *check point* sampai kerusakan DNA dapat diperbaiki. Kerusakan DNA *irreversible*, p53 akan menginduksi apoptosis. Rangsangan ligan terhadap reseptor menyebabkan trimerisasi dan menginduksi pembentukan *death-inducing signaling complex* (DISC) yang mengandung adaptor sitoplasma spesifik dan caspase-8. Beberapa protein adaptor misalnya *Fas-associated death domain* (FADD) berikatan dengan reseptor CD95 dan DR4/5, sedangkan *TNF-R-associated death domain* (TRADD) berasosiasi dengan TNF-R1. Protein adaptor FADD akan mengikat caspase-8/caspase-10 yang disebut *death effector domain* (DED). Caspase-8 yang teraktivasi (heterotetramer) dilepaskan dari DISC ke sitoplasma. Caspase-8 termasuk caspase inisiator yang akan mengaktivasi caspase eksekutor terutama melalui pro caspase-3 yang akan membawa ke program kematian sel. p53 berfungsi sebagai faktor transkripsi gen-gen yang berperan penting pada penghentian siklus sel, perbaikan DNA dan apoptosis. Hilangnya fungsi p53 pada beberapa sel kanker menyebabkan terjadinya instabilitas genomik, kegagalan regulasi siklus sel dan hambatan apoptosis (Prakosa et al. 2013, Sari 2018).

Jumlah ekspresi caspase-3 secara statistik pada ekspresi caspase-3 ekstrak herba kelakai terdapat perbedaan yang bermakna dengan nilai sig. $p < 0,05$ antara ekstrak IC_{50} , $\frac{1}{2} IC_{50}$, fraksi etil asetat $2 IC_{50}$, $\frac{1}{2} IC_{50}$ dan sel kontrol terhadap kontrol positif. Nilai sig $p > 0,05$ tidak terjadi perbedaan yang bermakna antara fraksi etil asetat $2 IC_{50}$, IC_{50} terhadap sel kontrol. Hal tersebut menunjukkan pada konsentrasi tertinggi yaitu $1731,67 \mu\text{g mL}^{-1}$ pada ekstrak dan fraksi etil asetat herba kelakai mampu meningkatkan persentase ekspresi pada sel kanker sehingga membuat sel tersebut mengalami apoptosis atau kematian sel dan terjadi pemecahan sel.

Kemampuan ekstrak dan fraksi dalam mengekspresi caspase-3 pada penelitian ini dapat melalui dua jalur, yaitu jalur ekstrinsik dengan meningkatkan *death receptor* seperti TNF dan Fas-L agar dapat memodulasi caspase-8 melalui pembentukan *death-inducing signaling complex* (DISC) yang kemudian melakukan aktivasi terhadap caspase-3 atau melalui jalur intrinsik yaitu dengan meningkatkan protein BAX dan BAK yang merupakan protein pengatur keluaranya

sitokrom-c pada mitokondria dan menekan protein Bcl-2 sehingga terjadi ikatan antara sitokrom-c, Apaf-1, dan caspase-9 yang membentuk suatu kompleks yang disebut apoptosom yang akan melakukan aktivasi ke caspase-3. Protein caspase-3 yang teraktivasi akan memecah protein pada lapisan inti sel seperti endonuklease, kemudian merusak benang kromatid pada kromosom sehingga fase mitosis terhambat. Sel akan berhenti melakukan proliferasi karena inti sel rusak, dan mengalami kematian sel atau apoptosis sel. Protein caspase-3 juga akan mengaktivasi protein p21 *activated kinase* yang akan membentuk badan apoptosis pada sel yang mengalami kematian, badan apoptosis ini berfungsi memberi sinyal kepada sel makrofag untuk melakukan fagositosis (Prakosa et al. 2013, Sari 2018). Studi ini baru meneliti uji sitotoksik herba kelakai terhadap sel kanker HepG2 pada protein p53 dan Caspase-3 sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap beberapa protein tertentu seperti BAX, BAD, MEKK, MAX dan lain-lain untuk mengetahui jalur sel apoptosis.

KESIMPULAN

Ekstrak fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat herba kelakai (*S. palustris* (Burm.f.) Bedd.) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap kultur sel kanker hati HepG2 dengan nilai IC_{50} 865,84; 568,38 dan $224,12 \mu\text{g mL}^{-1}$, sedangkan fraksi air tidak beraktivitas sitotoksik karena memiliki nilai $IC_{50} > 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Fraksi etil asetat memiliki tingkat keamanan dengan mempunyai nilai indeks selektivitas ≥ 3 . Etil asetat adalah fraksi teraktif dari herba kelakai yang dapat meningkatkan ekspresi protein p53 dan caspase-3 pada sel kanker hati HepG2 dengan konsentrasi 112,06 – $448,25 \mu\text{g mL}^{-1}$. Golongan senyawa flavonoid, alkaloid, dan tanin yang diduga memiliki potensi sebagai sitotoksik terhadap sel kanker hati HepG2.

DAFTAR PUSTAKA

Apriyanto DR, Hartati S, Dewi BE, Aoki-Utsubo C, Hotta H (2018) Aktivitas sitotoksitas ekstrak metanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap karsinoma hepatoseluler strain Huh7it-1 *cell line*. Tunas Med J Kedokteran dan

- Kesehatan 4: 1–4
- Arullappan S, Sawai S, Chee LA, Mahandan M, Shanmugavelan R (2017) Phytochemical screening and evaluation of cytotoxic effect and antioxidant activity of fractions isolated from *Stenochlaena palustris* (Burm.f.) Bedd. leaves. *Indian J Pharm Educ Res* 51: s735–s740. doi: 10.5530/ijper.51.4s.106
- CCRC (2009a) Prosedur Imunositokimia, Cancer Chemoprevention Research Center Farmasi UGM Yogyakarta, 1–7
- CCRC (2009b) Prosedur tetap uji sitotoksik metode MTT, Cancer Chemoprevention Research Center Farmasi UGM Yogyakarta, 6–9
- Chai TT, Kwek MT, Ong HC, Wong FC (2015) Water fraction of edible medicinal fern *Stenochlaena palustris* is a potent α -glucosidase inhibitor with concurrent antioxidant activity. *Food Chem* 186: 26–31. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.12.099
- Chear NJY, Fauzi AN, Khaw KY, Choi SB, Yaacob NS, Lai CS (2019) Free radical scavenging and cytotoxic properties of acylated and non-acylated kaempferol glycosides from *Stenochlaena palustris*: A perspective on their structure – activity relationships. *Pharm Chem J* 53: 188–193. doi: 10.1007/s11094-019-01977-2
- Chear NJY, Khaw K, Murugaiyah V, Lai CS (2016) Cholinesterase inhibitory activity and chemical constituents of *Stenochlaena palustris* fronds at two different stages of maturity. *J Food Drug Anal* 24: 358–366. doi: 10.1016/j.jfda.2015.12.005
- Darma AP, Ashari RA, Nugroho PA, Monikawati A, Fauzi IA, Hermawan A, Meiyanto E (2011) Aktivitas sitotoksik ekstrak etanolik herba ciplukan (*Physalis angulata* L.) pada sel kanker leher rahim HeLa melalui modulasi ekspresi protein p53. *Farmasains* 1: 28–35. doi: 10.22219/far.v1i2.1163
- Fatmawati D, Suparmi S, Yusuf I, Israhanto I (2018) Selektivitas antikanker ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*) pada lini sel kanker payudara. *J Bio-Site* 4: 21–40. doi: 10.22437/bs.v4i2.5440
- Gimenez-Bonafe P, Tortosa A, Perez-Tomas R (2009) Overcoming drug resistance by enhancing apoptosis of tumor cells. *Curr Cancer Drug Targets* 9: 320–340. doi: 10.2174/156800909788166600
- Istiqomah A, Muti'ah R, Hayati EK (2015) Anticancer activity against breast cancer cells T47D and identification of its compound from extracts and fractions of leaves bamboo grass (*Lophaterum gracile* B.). *Alchemy* 4: 6–16. doi: 10.18860/al.v4i1.3138
- Mardiyaningsih A, Ismiyati N (2014) Cytotoxic activity of ethanolic extract of *Persea americana* Mill. leaves on HeLa cervical cancer cell. *Trad Med J* 19: 24–28. doi: 10.22146/tradmedj.8087
- Margono DPNH, Suhartono E, Arwati H (2016) Potensi ekstrak kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.f) Bedd) terhadap kadar tumor necrosis factor- α (TNF- α) pada mencit BALB/c yang diinfeksi *Plasmodium berghei* Anka. *Berkala Kedokteran* 12: 77–85. doi: 10.20527/jbk.v12i1.359
- Moningka MEW (2019) Perkembangan terapi kanker terkait senyawa terpineol, p53 dan caspase 3. *J eBiomedik* 7: 37–43. doi: 10.35790/ebm.7.1.2019.23190
- Muti'ah R, Listyana A, Suryadinata A (2017) Aktivitas antikanker kombinasi ekstrak benalu belimbing (*Macrosolen cochinchinensis*) dan bawang sabrang (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr.) pada sel kanker serviks (sel HeLa). *Trad Med J* 22: 146–152. doi: 10.22146/mot.22009
- Nurhasnawati H, Sundu R, Sapri S, Supriningrum R, Kuspradini H, Arung ET (2019) Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of several indigenous species of ferns in East Kalimantan, Indonesia. *Biodiversitas* 20: 576–580. doi: 10.13057/biodiv/d200238
- Nurmilatina N (2017) Analisis komposisi kimia daun kelakai (*Stenochlaena palustris* Bedd.) dengan berbagai pelarut menggunakan GCMS. *J Ris Ind Hasil Hutan* 9: 9–16. doi: 10.24111/jrihh.v9i1.2952
- Prakosa T, Askandar B, Fauziah D (2013) Ekspresi p53 mutan dan caspase 3 sebagai faktor prediksi terhadap operabilitas kanker serviks IIB setelah mendapat kemoterapi neoadjuvan. *Indones J Cancer* 7: 61–67. doi: 10.33371/ijoc.v7i2.296
- Pratiwi L, Fudholi A, Martien R, Pramono S (2016) Ethanol extract, ethyl acetate extract, ethyl acetate fraction, and n-

- heksan fraction mangosteen peels (*Garcinia mangostana* L.) as source of bioactive substance free-radical scavengers. *J Pharm Sci Clin Res* 1: 71–82. doi: 10.20961/jpscr.v1i2.1936
- Rostinawati T, Suryana S, Fajrin M, Nugrahani H (2018) Aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F.) Bedd) terhadap *Salmonella typhi* dan *Staphylococcus aureus* dengan metode difusi agar CLSI M02-A11. *Pharmauho* 3: 1–5. doi: 10.33772/pharmauho.v3i1.3444
- Sari LM (2018) Apoptosis: Mekanisme molekuler kematian sel. *Cakradonya Dent J* 10: 65–70. doi: 10.24815/cdj.v10i2.11701
- Sia D, Villanueva A, Friedman SL, Llovet JM (2017) Liver cancer cell of origin, molecular class, and effects on patient prognosis *Gastroenterology* 152: 745–761. doi: 10.1053/j.gastro.2016.11.048
- Sirait PS, Setyaningsih I, Tarman K (2019) Aktivitas antikanker ekstrak *Spirulina* yang dikultur pada media walne dan media organik. *J Pengolahan Hasil Perikanan Indones* 22: 50–59. doi: 10.17844/jphpi.v22i1.25876
- Suling L, Augustina I, Fatmaria F (2020) Uji daya bunuh ekstrak etanol 70% kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F.) Bedd) terhadap larva instar III *Aedes aegypti*. *Herb Med J* 3: 6–11. doi: 10.30595/hmj.v3i1.6375
- Suryadini H (2019) Uji parameter standard dan penapisan fitokimia pada daun steril kalakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F.) Bedd.) menggunakan ekstraksi bertingkat. *J Ilm Farm Farmasyifa* 2: 40–51. doi: 10.29313/jiff.v2i1.3968
- Syamsul ES, Hakim YY, Nurhasnawati H (2019) Penetapan kadar flavonoid ekstrak daun kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F.) Bedd.) dengan metode spektrofotometri UV-Vis. *J Ris Kefarmasian Indones* 1: 11–20. doi: 10.33759/jrki.v1i1.46
- Uthia R, Arifin H, Efrianti F (2017) Pengaruh hasil fraksinasi ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum* L.) terhadap aktivitas susunan saraf pusat pada mencit putih jantan. *J Farm Higea* 9: 85–95. doi: 10.52689/higea.v9i1.161
- WHO (2021) Cancer. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> World Health Organization, diakses pada 27 April 2021
- Wong RSY (2011) Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 30: 87. doi: 10.1186/1756-9966-30-87
- Yu HY, Zhang XQ, Li X, Zeng FB, Ruan HL (2013) 2-methoxyjuglone induces apoptosis in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells and exhibits in vivo antitumor activity in a H22 mouse hepatocellular carcinoma model. *J Nat Prod* 76: 889–895. doi: 10.1021/np400025b