

**UJI SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL DAUN BIDARA ARAB
(*Ziziphusspina-christi* L) TERHADAP SEL KANKER SERVIKS (HELA)
MENGUNAKAN METODE MICROTETRAZOLIUM Assay (MTT Assay)**

Emi Khoirimatul Barokah^{1*}, Rina Nurmaulawati², Yudha Fika Diliyana³
Program Studi Farmasi, STIKES Bhakti Husada Mulia Madiun, Indonesia^{1,2,3}

Email¹: barokahemikhoirimatul@gmail.com

ABSTRAK

Kanker serviks merupakan salah satu penyebab utama kematian pada wanita di Indonesia, dan penanganannya masih menghadapi tantangan terkait efektivitas dan efek samping terapi. Daun Bidara Arab (*Ziziphus spina-christi* L.) diketahui mengandung senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin yang berpotensi sebagai agen antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas sitotoksik ekstrak etanol daun Bidara Arab terhadap sel kanker serviks (HeLa) secara *in vitro* menggunakan metode Microtetrazolium Assay (MTT Assay). Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% 3x24 jam. Uji fitokimia menunjukkan adanya senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin. Uji sitotoksik dilakukan terhadap sel HeLa dengan konsentrasi 7,813 µg/mL, 15,625 µg/mL, 31,25 µg/mL, 62,5 µg/mL, dan 125 µg/mL selama 24 jam, dan absorbansi diukur menggunakan ELISA reader. Hasil menunjukkan penurunan viabilitas sel terkecil pada konsentrasi 125 µg/mL, dengan nilai IC₅₀ sebesar 31,97 µg /mL, yang menunjukkan bahwa ekstrak memiliki aktivitas sitotoksik yang aktif terhadap sel kanker. Dengan demikian, ekstrak etanol daun Bidara Arab berpotensi sebagai kandidat antikanker alami, meskipun diperlukan penelitian lebih lanjut untuk isolasi senyawa aktif dan uji toksisitas pada sel normal maupun *in vivo*.

Kata Kunci: Daun Bidara Arab, Sitotoksik, HeLa, MTT Assay

ABSTRACT

Cervical cancer remains one of the leading causes of death among women in Indonesia, and its treatment continues to face challenges regarding effectiveness and side effects. The leaves of Ziziphus spina-christi L. (Bidara Arab) contain secondary metabolites such as alkaloids, flavonoids, saponins, and tannins, which are known to possess anticancer potential. This study aimed to evaluate the cytotoxic activity of ethanolic extract of Bidara Arab leaves against cervical cancer (HeLa) cells using the Microtetrazolium Assay (MTT Assay) in vitro. Extraction was performed by maceration using 96% ethanol 3x24 hours. Phytochemical screening confirmed the presence of alkaloids, flavonoids, saponins, and tannins. Cytotoxic testing was conducted on HeLa cells treated with increasing concentrations of the extract 7,8 µg/mL, 15,625 µg/mL, 31,25 µg/mL, 62,5 µg/mL, and 125 µg/mL for 24 hours, and absorbance was measured using an ELISA reader. The results showed the lowest cell viability at a concentration 125 µg/mL with an IC₅₀ value of 35,91

µg/mL, indicating a active cytotoxic effect of the extract on HeLa cells. These findings suggest that the ethanolic extract of Bidara Arab leaves has promising potential as a natural anticancer agent. However, further studies are needed to isolate the active compounds and assess their toxicity in normal cells and in vivo models.

Keywords: *Ziziphus spina-christi, Cytotoxic, HeLa, MTT Assay*

PENDAHULUAN

Kanker serviks merupakan salah satu penyebab utama morbiditas dan mortalitas pada wanita, terutama di negara berkembang termasuk Indonesia. Penyakit ini umumnya disebabkan oleh infeksi *Human Papilloma Virus* (HPV) yang memicu pertumbuhan sel abnormal pada serviks. Terapi konvensional seperti pembedahan, kemoterapi, dan radioterapi masih digunakan, namun sering menimbulkan efek samping serius serta keterbatasan efektivitas sehingga mendorong pencarian alternatif pengobatan berbasis bahan alam yang lebih aman.

Indonesia memiliki keragaman hayati yang kaya akan tanaman obat, salah satunya daun Bidara Arab (*Ziziphus spina-christi* L.). Daun ini secara tradisional digunakan untuk mengatasi berbagai penyakit, dan diketahui mengandung metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan steroid yang memiliki aktivitas biologis penting, termasuk antioksidan dan antikanker. Beberapa penelitian melaporkan aktivitas sitotoksik ekstrak daun Bidara Arab terhadap sel kanker kolon dan payudara, melalui mekanisme induksi apoptosis dan penghambatan siklus sel. Namun, kajian mengenai efeknya pada sel kanker serviks (HeLa) masih terbatas.

Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi aktivitas sitotoksik ekstrak etanol daun Bidara Arab terhadap sel kanker serviks (HeLa) menggunakan metode *Microtetrazolium Assay* (MTT Assay). Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan bukti ilmiah mengenai potensi daun Bidara Arab sebagai kandidat sumber obat antikanker alami, sekaligus menjadi dasar bagi penelitian lanjutan terkait isolasi senyawa aktif dan pengujian toksisitasnya.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei – Juni 2025. Proses determinasi tanaman dilakukan di UPF Pelayanan Kesehatan Tradisional Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Pembuatan ekstrak dan uji fitokimia dilakukan di Laboratorium STIKES Bhakti Husada Mulia Madiun, sedangkan uji sitotoksik dengan metode MTT Assay dilaksanakan di Laboratorium Riset Terpadu (LRT) Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Alat

Alat yang digunakan meliputi beaker glass (Pyrex), kertas saring (Whatman), rotary evaporator (Heidolph), corong porselen (Iwaki), autoklaf (Hirayama), mikropipet (Gilson), inkubator CO₂ (Heraeus), inverted microscope (Zeiss MC 80), hemocytometer (Neubauer), centrifuge (Sorvall), ELISA reader (SLT 240 ATC), serta 96-well plate (Nunc).

Bahan

Bahan penelitian terdiri atas daun Bidara Arab (*Ziziphus spina-christi* L.) yang diekstraksi dengan etanol 96% (Merck). Untuk uji sitotoksik digunakan sel kanker serviks (HeLa), medium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), FBS 10% (Gibco), antibiotik penisilin-streptomisin 1% (Gibco), Fungison 0,5% (Gibco), larutan PBS, tripsin-EDTA 0,025%, reagen MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], pelarut DMSO (dimetil sulfoksida), serta larutan stopper SDS 10% dalam HCl 0,1 N

Prosedur Penelitian

Pembuatan Ekstrak Daun Bidara Arab (*Ziziphus spina-christi* L.)

Daun Bidara Arab (*Ziziphus spina-christi* L.) dicuci bersih, dikeringkan pada suhu 40°C, lalu dihaluskan menjadi serbuk simplisia. Sebanyak 500 g serbuk dimaserasi dengan etanol 96% (5 L) selama 3 × 24 jam, kemudian disaring. Filtrat diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 50°C dan dilanjutkan dengan waterbath 65°C hingga diperoleh ekstrak etanol kental. Rendemen dari proses ini dihitung dengan rumus rendamen :

$$\%Rendemen = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

Uji Fitokimia Ekstrak Daun Bidara Arab (*Ziziphus spina-christi* L.)

Uji Alkaloid

Sebanyak 2 mL ekstrak ditambahkan pereaksi Mayer dan Dragendorff. Terbentuknya endapan putih (Mayer) atau jingga-merah (Dragendorff) menunjukkan hasil positif.

Uji Flavonoid

Ekstrak dicampur dengan serbuk magnesium dan HCl pekat. Perubahan warna merah, kuning, atau jingga menandakan adanya flavonoid

Uji Saponin

Ekstrak dikocok kuat dengan air. Terbentuk busa stabil setinggi 1–10 cm menunjukkan adanya saponin.

Uji Tanin

Ekstrak ditambah larutan FeCl_3 1%. Perubahan warna menjadi biru tua atau hitam kehijauan menunjukkan adanya tanin

Uji Terpenoid

Ekstrak dalam kloroform ditambah H_2SO_4 pekat melalui dinding tabung. Terbentuknya cincin cokelat kemerahan pada batas larutan menandakan adanya terpenoid.

Uji Steroid

Ekstrak dalam kloroform ditambahkan asam asetat anhidrat dan H_2SO_4 pekat. Perubahan warna hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid.

Uji MTT assay

Sel HeLa ditanam dalam 96-well plate dan diinkubasi 24 jam. Selanjutnya ditambahkan ekstrak etanol daun Bidara Arab dengan variasi konsentrasi, lalu diinkubasi kembali selama 24 jam. Setelah itu ditambahkan larutan MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], diinkubasi 4 jam hingga terbentuk kristal formazan. Kristal kemudian dilarutkan dengan SDS 10% dalam HCl 0,1 N, dan absorbansi dibaca menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm untuk menentukan viabilitas sel dan nilai IC_{50} .

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstrak Etanol Daun Bidara Arab (*Ziziphus spina-christi L.*)

Proses maserasi 500 g serbuk simplisia daun Bidara Arab dengan pelarut etanol 96% menghasilkan ekstrak kental sebanyak 128,2 g dengan persentase rendemen 25,64%. Rendemen ini menunjukkan bahwa metode maserasi dengan etanol mampu mengekstraksi senyawa metabolit sekunder secara optimal, sesuai dengan laporan penelitian sebelumnya yang menggunakan pelarut polar untuk tanaman sejenis.

Tabel 1. Data Ekstraksi

Ekstrak	Berat Simplisia Basah (gram)	Berat Serbuk (gram)	Berat Ekstrak Kental (gram)	Rendamen (%)
Daun Bidara Arab	4000 g	500 g	128,2 g	25,64%

Identifikasi Senyawa Alkaloid

Uji Mayer dan Dragendorff menunjukkan hasil positif ditandai terbentuknya endapan putih dan jingga. Senyawa alkaloid dikenal memiliki aktivitas antikanker melalui mekanisme penghambatan proliferasi sel dan induksi apoptosis.



Gambar 1. Hasil Uji Alkaloid

Identifikasi Senyawa Flavonoid

Uji Shinoda memberikan perubahan warna merah-jingga, menandakan adanya flavonoid. Senyawa ini berfungsi sebagai antioksidan kuat yang mampu menangkap radikal bebas serta menghambat pertumbuhan sel kanker.



Gambar 2. Hasil Uji Flavonoid

Identifikasi Senyawa Saponin

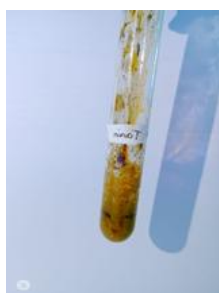
Uji busa menghasilkan busa stabil, menunjukkan adanya saponin. Saponin dapat meningkatkan permeabilitas membran sel kanker sehingga memicu lisis sel dan mendukung aktivitas sitotoksik.



Gambar 3. Hasil Uji Saponin

Identifikasi Senyawa Tanin

Uji dengan FeCl_3 1% menghasilkan warna biru tua–hitam kehijauan, menunjukkan adanya tanin. Tanin memiliki aktivitas antioksidan dan dapat menghambat pertumbuhan sel melalui pengikatan protein dan enzim tertentu.



Gambar 4. Hasil Uji Tanin

Identifikasi Senyawa Terpenoid

Uji Terpenoid menghasilkan cincin cokelat kemerahan pada batas larutan, menandakan adanya terpenoid. Senyawa ini diketahui memiliki efek antitumor melalui penghambatan proliferasi dan induksi apoptosis tetapi dari hasil tersebut negatif dikarena metode ekstraksi suhu *waterbath* yang terlalu tinggi.



Gambar 5. Hasil Uji Terpenoid

Identifikasi Senyawa Steroid

Uji steroid menunjukkan perubahan warna hijau kebiruan, menandakan adanya steroid. Senyawa steroid berperan sebagai antiinflamasi dan antitumor sehingga mendukung potensi antikanker dari ekstrak. Tetapi hasil di sini negatif dikarenakan metode ekstraksi dengan suhu yang terlalu tinggi.



Gambar 6. Hasil Uji Steroid

Viabilitas Uji MTT Assay

Hasil uji MTT menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun bidara arab mampu menurunkan viabilitas sel HeLa secara konsentrasi–dependen. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang diberikan, persentase viabilitas sel semakin menurun, yang menunjukkan adanya aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker serviks. Berikut tabel viabilitas :

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

Tabel 2. Data Viabilitas Uji MTT Assay

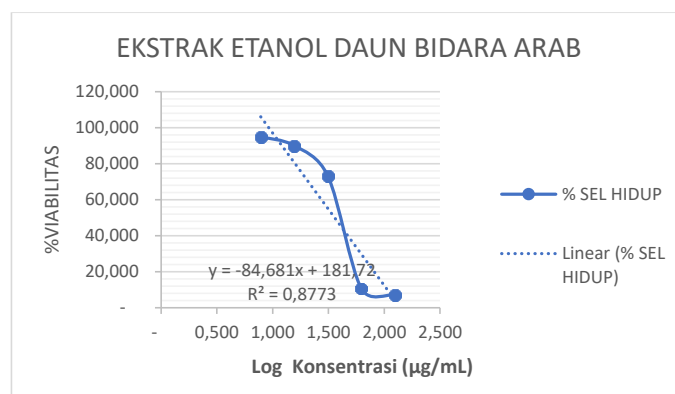
Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi			Rata-rata ABS	Viabilitas Sel Hidup (%)
	1	2	3		
7,813	0,575	0,574	0,565	0,571	94,78
15,625	0,612	0,412	0,617	0,547	89,980
31,250	0,457	0,457	0,475	0,463	73,146
62,5	0,145	0,151	0,157	0,151	10,621
125	0,132	0,137	0,131	0,133	7,014
Kontrol media	0,098				
Kontrol sel	0,597				

Analisis Data Regresi Linier

Analisis data dengan metode regresi linier menunjukkan hubungan yang kuat antara konsentrasi ekstrak dengan persen inhibisi sel. Persamaan garis regresi

digunakan untuk menentukan titik konsentrasi yang memberikan 50% hambatan pertumbuhan sel. Berikut adalah hasil data regresi linier daun Bidara Arab

Persamaan Regresi



Gambar 7. Hasil Data Regresi Linier Daun Bidara Arab

IC₅₀ Ekstrak Etanol Daun Bidara Arab (*Ziziphus spina-christi* L.)

Dari perhitungan diperoleh nilai IC₅₀, yang menggambarkan konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat 50% pertumbuhan sel HeLa. Nilai ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun bidara arab memiliki potensi sitotoksik dan berpeluang untuk dikembangkan sebagai agen antikanker alami. Berikut adalah perhitungan IC₅₀

$$Y = -84,681x + 181,72$$

$$50 = -84,681x + 181,72$$

$$X = \frac{50 - 181,72}{-84,681} = 1,555 \text{ Antilog} = 35,91 \text{ Jadi, nilai IC}_{50} \text{ Ekstrak}$$

Etanol Daun Bidara Arab adalah 35,91 µg/mL

KESIMPULAN

Ekstrak etanol daun bidara arab (*Ziziphus spina-christi* L). Menunjukkan bahwa ekstrak mampu menurunkan viabilitas sel HeLa secara konsentrasi–dependen. Analisis regresi linier menghasilkan nilai IC₅₀ sebesar ±31,97 µg/mL, yang termasuk kategori aktif sebagai agen sitotoksik. Dengan demikian, ekstrak etanol daun bidara arab berpotensi dikembangkan sebagai kandidat obat antikanker alami, meskipun diperlukan penelitian lebih lanjut pada sel normal dan uji in vivo untuk memastikan keamanan serta efektivitasnya

DAFTAR PUSTAKA

1. Abdulrahman, M., Al-Ghamdi, A., & Al-Malki, A. (2022). Phytochemical screening and antioxidant activity of *Ziziphus spina-christi* fruits. *Journal of Medicinal Plants Research*, 16(4), 112–120. <https://doi.org/10.xxxx/jmpr.2022>
2. Aisyah, R., Suryani, D., & Wulandari, R. (2022). Aktivitas antibakteri ekstrak daun bidara (*Ziziphus spina-christi* L.) terhadap bakteri penyebab jerawat. *Jurnal Farmasi Sains dan Terapan*, 9(2), 45–52.
3. Aniarti, R. (2024). Kajian molekuler pertumbuhan sel kanker: Regulasi proliferasi dan apoptosis. *Jurnal Biologi Sel*, 12(1), 13–20.
4. Anggarani, R., Putri, N., & Lestari, A. (2023). Senyawa bioaktif daun bidara arab (*Ziziphus spina-christi* L.) dan potensinya sebagai antioksidan. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 10(3), 89–98.
5. Apriantoro, R., & Kartika, D. (2023). Mekanisme infeksi HPV dalam karsinogenesis kanker serviks. *Majalah Kedokteran Andalas*, 46(2), 105–112.
6. Asrulla, A., Hidayat, M., & Ningsih, F. (2023). Metodologi penelitian kesehatan. Surabaya: Airlangga University Press.
7. Aulia, N. (2019). Uji sitotoksik ekstrak etanol daun pepaya dengan metode MTT assay terhadap sel HeLa. *Jurnal Farmasi Indonesia*, 6(2), 77–83.
8. Bakhtra, Y., Dewi, S., & Prasetyo, H. (2023). Kultur sel HeLa sebagai model penelitian kanker serviks. *Jurnal Kedokteran Eksperimental*, 15(1), 33–41.
9. Beno, R., Santoso, D., & Lestari, E. (2022). Infeksi HPV sebagai faktor utama kanker serviks. *Jurnal Obstetri & Ginekologi Indonesia*, 50(3), 178–185.
10. Elsherbiny, E. (2023). Cytotoxic effect of *Ziziphus spina-christi* extract alone and in combination with doxorubicin on breast cancer cells. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 23(1), 112. <https://doi.org/10.1186/s12906-023>
11. Hastiana, L., Wibowo, P., & Maulida, H. (2022). Analisis kadar metabolit sekunder daun bidara arab (*Ziziphus spina-christi* L.). *Jurnal Kimia Farmasi Indonesia*, 9(1), 21–30.
12. Harefa, S., & Khairunnisa, F. (2023). Epidemiologi dan faktor risiko kanker serviks di Indonesia. *Jurnal Kesehatan Reproduksi*, 14(2), 56–64.
13. Ismiyati, E., & Nurhaeni, L. (2016). Prosedur kultur sel HeLa dalam penelitian farmasi. *Jurnal Laboratorium Medik*, 5(2), 44–52.
14. Jamal, S. (2024). *Ziziphus spina-christi*: Ethnobotany, phytochemistry, and pharmacological properties. *Journal of Herbal Medicine*, 15(1), 65–74.
15. Karim, R., Sari, M., & Nugroho, P. (2021). Terapi kanker serviks: Tinjauan terbaru. *Jurnal Onkologi Indonesia*, 9(2), 91–100.