

7 Uji Sitotoksik Ekstrak Metanol dan Fraksi Daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Del.) Terhadap Sel B16F10 pada Kanker Melanoma

*Cytotoxic Potential of Extract Methanol and Fraction of African Leaf (*Vernonia amygdalina* Del.) on B16F10 Cell Line in Melanoma Cancer*

Sahwani Risqina Lubis¹, Poppy Anjelisa Zaitun Hasibuan^{2*}, Denny Satria³

^{1,2}Departemen Farmakologi, Fakultas Farmasi, Universitas Sumatera Utara, Medan, Sumatera Utara, Indonesia
Email: poppyanjelisa@usu.ac.id

³Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Sumatera Utara, Medan, Sumatera Utara, Indonesia
Email: dennysatria@usu.ac.id

Abstrak

Melanoma merupakan jenis kanker agresif yang berasal dari melanosit dan dikenal sebagai bentuk kanker kulit yang paling berbahaya. Bahan alam semakin banyak mendapat perhatian sebagai sumber potensial dalam penemuan agen antikanker baru. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas sitotoksik ekstrak metanol dan fraksi kloroform daun *Vernonia amygdalina* Delile. terhadap sel melanoma B16F10. Daun *Vernonia amygdalina* Delile. diekstraksi menggunakan metode refluks, kemudian dilakukan fraksinasi cair-cair. Identifikasi senyawa yang terkandung dalam ekstrak dan fraksi dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis. Sel B16F10 dikultur dalam kondisi standar dan diberi perlakuan dengan berbagai konsentrasi fraksi kloroform serta ekstrak metanol daun *Vernonia amygdalina* Delile. Uji sitotoksitas dilakukan menggunakan metode MTT untuk menentukan viabilitas sel dan nilai IC₅₀. Hasil analisis menunjukkan bahwa fraksi kloroform memiliki nilai IC₅₀ sebesar 81,80 ± 4,18, diikuti oleh fraksi n-heksana sebesar 187,33 ± 12,48, fraksi etil asetat sebesar 204,35 ± 8,39, ekstrak metanol sebesar 344,37 ± 25,12, dan fraksi residu sebesar 4032,38 ± 921,22. Seluruh fraksi dan ekstrak metanol menunjukkan aktivitas sitotoksik yang bergantung pada dosis, dengan fraksi kloroform memperlihatkan efek penghambatan yang paling kuat. Penelitian ini menunjukkan bahwa daun *Vernonia amygdalina* mengandung senyawa bioaktif yang berpotensi signifikan sebagai agen antikanker terhadap melanoma. Penelitian lanjutan perlu difokuskan pada isolasi senyawa aktif serta pengujian *in vivo* secara komprehensif guna memperkuat potensi terapeutiknya.

Kata kunci: *Vernonia amygdalina* Del.; sitotoksik; sel B16F10; melanoma; IC₅₀.

Abstract

Melanoma is a highly aggressive malignancy derived from melanocytes and is considered the most severe form of skin cancer. Natural products have increasingly attracted attention as potential sources for the discovery of novel anticancer agents. The purpose of this study is to assess the cytotoxic activity of *Vernonia amygdalina* Delile leaf methanol extract and chloroform fraction against B16F10 melanoma cells. *Vernonia amygdalina* Del. Leaves extracted using reflux method and liquid-liquid fractionation. Identification of the contained compounds were identified using thin layer chromatography. B16F10 cells were cultured under standard conditions and treated with various concentrations of the chloroform fraction and methanol extract of *Vernonia amygdalina* Delile leaves and the cytotoxicity assay was performed using the MTT method to determine cell viability and IC₅₀ values. The analysis revealed IC₅₀ values of chloroform fraction (81.80±4.18) and followed by n-hexane fraction (187.33±12.48), etil acetate fraction (204.35±8.39), methanol extract (344.37±25.12) and residual fraction (4032.38±921.22). All fraction and the methanol extract demonstrated dose-dependent cytotoxicity, with the chloroform fraction exhibiting a more pronounced inhibitory effect. These results suggest that *Vernonia amygdalina* leaves contain bioactive constituents with significant anticancer potential against melanoma. Future studies should focus to the isolation of active compounds and comprehensive *in vivo* validation to strengthen the therapeutic prospects.

Keywords: *Vernonia amygdalina* Del.; Cytotoxic Potentia; B16F10 cell line; melanoma cancer; IC₅₀; *in vitro*

*Corresponding author: Poppy Anjelisa Zaitun Hasibuan, Institusi, Kota, Negara

E-mail : poppyanjelisa@usu.ac.id

Doi : 10.35451/dy31640

Received : March 23, 2026, Accepted: April 23, 2026, Published: April 30, 2026

Copyright: © 2026 Poppy Anjelisa Zaitun Hasibuan(s). Creative Commons License This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

1. PENDAHULUAN

Penyakit kanker masih menjadi masalah kesehatan dengan tingkat kematian tertinggi di dunia maupun di Indonesia. Kanker melanoma termasuk dalam penyakit kanker kulit paling ganas karena menyebar lebih cepat dibandingkan kanker kulit lainnya. Menurut data GLOBOCAN tahun 2022, kanker kulit termasuk melanoma menduduki peringkat ke-22 penyebab kematian akibat kanker pada populasi dewasa, dengan prevalensi yang lebih tinggi di daerah tropis seperti Indonesia karena faktor lingkungan. Proyeksi untuk tahun 2025 menunjukkan bahwa kasus kanker kulit dapat meningkat hingga 20% jika tidak ada intervensi pencegahan yang efektif [1]. Sel B16F10 mengandung berbagai miRNA yang berperan dalam sintesis melanin dan berkontribusi terhadap proses pembentukan melanin pada melanosit melalui jalur yang berbeda dari regulator sintesis melanin lainnya sehingga digunakan dalam penelitian kanker melanoma dikarenakan pertumbuhannya cepat dan memiliki kemampuan metastasis tinggi serta modelnya yang menyerupai karakteristik sel melanoma manusia. Sel B16F10 digunakan untuk mempelajari respon autofagi, apoptosis, proliferasi sel, dan invasi tumor [2].

Berdasarkan literatur, famili Asteraceae memiliki potensi besar sebagai sumber antioksidan alami untuk melindungi sistem pernapasan dari kerusakan akibat stres oksidatif. Dilakukan analisis terhadap sepuluh artikel terpilih, ditemukan sepuluh spesies dari famili ini melalui uji *in vivo* dan *in vitro* menunjukkan adanya aktivitas antioksidan yang kuat, terutama melalui kandungan senyawa aktif seperti flavonoid, asam fenolat, seskuiterpen, dan triterpenoid [3].

Vernonia amygdalina Del. yang dikenal secara lokal di Indonesia sebagai daun afrika kaya akan senyawa bioaktif seperti seskuiterpen lakton (misalnya vernodalin dan vernolide), flavonoid (luteolin dan quercetin), saponin, dan polifenol, yang diketahui memiliki aktivitas antioksidan, anti-inflamasi, dan antikanker. Seskuiterpen lakton adalah senyawa utama dari hasil isolasi daun Afrika dengan potensial aktivitas sitotoksik dan dapat menghambat pertumbuhan sel kanker, mempunyai aktivitas antitumor dan antimikroba, serta kemampuan bakterisidal yang efektif dalam membunuh bakteri.

Uji Sitotoksik akut dilakukan dengan prinsip pemberian beberapa tingkat dosis kepada target pengujian kemudian diamati efek toksik yang ditunjukkan dengan kematian target uji tersebut lalu memperoleh nilai dosis letal 50 suatu bahan obat atau sediaan. Uji toksisitas akut dilakukan untuk mengamati dan membuktikan adanya toksisitas intrinsik suatu bahan obat atau sediaan, menentukan target terapi, respon imun, mendapatkan informasi bahaya setelah paparan zat secara cepat dan sebagai informasi awal yang dapat digunakan untuk menentukan tingkat dosis [4]. Nilai IC_{50} menunjukkan potensi sitotoksik suatu senyawa, di mana semakin tinggi nilai IC_{50} maka semakin rendah tingkat toksisitasnya. Tahap akhir dari pengujian sitotoksik bertujuan untuk menentukan konsentrasi maksimum senyawa yang masih memungkinkan sel bertahan hidup.

Pada penelitian sebelumnya oleh Hasibuan et al (2023) telah dilakukan pengujian aktivitas sitotoksik pada sel PANC-1 kanker pankreas dengan nilai IC_{50} sebesar $21,19 \pm 0,64 \mu\text{g/mL}$, pada penelitian yang dilakukan oleh Pratiwi dan Gunawan (2018) menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun Afrika terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* memiliki zona hambat sebesar 6,69 mm dan 6,52 mm pada uji antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan pada penelitian Rosalina dkk (2024) menunjukkan *Vernonia amygdalina* memiliki aktivitas antioksidan menggunakan metode ABTS dengan nilai IC_{50} terbaik pada fraksi etil asetat sebesar $78,27 \pm 0,25 \mu\text{g/mL}$ dan $56,2 \pm 11,42 \mu\text{g/mL}$ menggunakan metode DPPH [5-7].

Berdasarkan uraian diatas dapat dilihat bahwa *Vernonia amygdalina* memiliki potensi dalam pengembangan obat tradisional. Namun, penelitian mengenai potensi *Vernonia amygdalina* terhadap kanker melanoma masih sangat terbatas, sedangkan melanoma merupakan salah satu kanker yang bersifat agresif dan sering mengalami resisten pada terapi konvensional [8]. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas sitotoksik ekstrak metanol dan fraksi daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Del.) terhadap sel B16F10 pada kanker melanoma dalam pengembangan kandidat agen antikanker berbasis bahan alam.

2. METODE

Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental meliputi proses pengumpulan dan pengolahan daun Afrika, fraksinasi ekstrak methanol daun Afrika hingga uji aktivitas sitotoksik fraksi dan ekstrak methanol daun Afrika menggunakan metode MTT pada sel B16F10.

Bahan

Bahan yang digunakan diantaranya daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Del.), doksorubisin (KalbeMed), etil asetat p.a. (Merck), larutan dimetilsulfoksida/DMSO, media *Rosswel Park Memorial Institute* (RPMI), metanol p.a. (Merck), mikropipet (*Dragonlab*), n-heksana p.a. (Merck), pereaksi Bouchardat, pereaksi Dragendorff, Pereaksi Vanilin-Asam Sulfat, Pereaksi Asam Sulfat 50%, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), plat KLT *silica gel* 60 GF254 (Merck), sel kanker melanoma B16F10, sarung tangan karet (*OneMed*), tisu (*Nice*), *tissue culture flask*.

Alat

Alat yang digunakan meliputi set alat gelas, *Bio Safety Cabinet* (*thermoscientific*), corong pisah (*Duran*), *chamber* (CAMAG), desikator, hemositometer (*Assistent*), inkubator CO₂ (NAPCO), klem, kondensor, kurs porselen bertutup, labu alas bulat (*Schott Duran*), labu bersumbat (*Iwaki*), lemari pengering, *microplate reader* (*Biorad iMark*), plate 96 sumuran.

Prosedur

Pengambilan dan Pengumpulan Sampel

Sampel diambil dengan metode purposif yaitu tidak membandingkan dengan spesies yang sama dari daerah lainnya. Sample yang digunakan pada penelitian ini adalah daun afrika (*Vernonia amygdalina* Delile) yang diambil di Jl. Bandrek, Kelurahan Lantasan Baru Kecamatan Patumbak, Kabupaten Deli Serdang, Sumatera Utara.

Pengolahan dan Karakterisasi Sampel

Daun Afrika diproses setelah dibersihkan lalu dikeringkan dan dihaluskan dengan blender. Simpan di tempat kering dengan keadaan tertutup rapat [9].

Profiling Senyawa dengan Metode KLT

Pemeriksaan senyawa metabolit sekunder pada ekstrak metanol, fraksi n-heksana, fraksi kloroform, fraksi etil asetat dan fraksi sisa daun Afrika. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah metode yang digunakan untuk identifikasi senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, sapoin, flavonoid, glikosida, steroid/terpenoid dan senyawa seskuiterpen lakton dengan fase gerak methanol: diklorometana (9:1) dengan LP asam sulfat 50% dengan pemanasan di suhu 105°C selama 5 menit. Noda merah keunguan menandakan sampel tersebut positif mengandung steroid [10].

Kultur Sel B16F10

Pada uji antikanker ini alat-alat yang digunakan harus disterilisasi dengan autoklaf di suhu 121°C selama 15 menit. Lalu dibuat media kultur dengan Satu sachet bubuk RPMI dicampurkan dengan masing-masing 2gram Hepes dan natrium bikarbonat (NaHCO₃) ke dalam erlenmeyer, dan ditambahkan 800 mL aquabidest steril lalu sesuaikan pH (7,2-7,4) dan dicampurkan 10% FBS, 2% Penisilin-Streptomisin, dan 0,5% Fungizone (Amphoterasin B), kemudian diencerkan dengan 100 mL medium RPMI dan diberi label. Media yang telah jadi disimpan pada suhu 2–8°C. Lalu ditanam sel dengan 10 mL media menggunakan tabung konik 15 mL. Diambil suspensi sel, tambahkan secara bertahap ke dalam media dan amati kondisi sel menggunakan mikroskop inverted dan simpan dalam inkubator CO₂. Resuspensi sel dan dipanen sel dengan penambahan 400 µL larutan Tripsin EDTA 0,25% dan inkubasi dalam inkubator CO₂ selama kurang lebih 5 menit. Lalu ditambahkan 4 mL MK untuk menonaktifkan tripsin. Suspensikan kembali sel menggunakan mikropipet dan amati dengan mikroskop inverted untuk memastikan sel terpisah satu per satu dan tidak menggumpal lalu hitung pada hemositometer di bawah mikroskop menggunakan alat penghitung sel (*cell counter*) [10].

Pembuatan Seri Konsentrasi Larutan Uji

Sebanyak 5 mg sampel dan 2 mg/ml dilarutkan dalam 100 µL dimetilsulfoksida (DMSO) dan dikocok menggunakan vortex hingga larut sempurna, lalu diencerkan dengan media kultur lengkap (MK). Setelah itu, dilakukan pengenceran bertahap untuk memperoleh larutan uji dengan konsentrasi sampel sebesar 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, dan 3,125 µg/mL, serta larutan doksorubisin dengan konsentrasi 0,1, 0,05, 0,025, 0,0125, dan 0,00625 µg/mL. Seluruh proses pengenceran dilakukan menggunakan media RPMI lengkap [10].

Uji Sitotoksik Pada Sel B16F10

Sel kanker B16F10 dipipet ke dalam microplate 96 sumur dengan jumlah 10.000 sel per sumur, kemudian didiamkan dalam incubator CO₂ selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi media diganti baru lalu seri konsentrasi larutan uji dilarutkan dengan DMSO dan ditambahkan ke setiap sumuran lalu dilanjutkan inkubasi

selama 24 jam. Setelah perlakuan, medium dibuang, dan sel dicuci menggunakan larutan PBS. Setiap sumuran kemudian diberi 100 µL media RPMI lengkap dan 10 µL larutan MTT. Inkubasi dilanjutkan selama 4–6 jam pada suhu 37°C dalam inkubator CO₂ untuk memungkinkan reaksi berlangsung. Selanjutnya, ditambahkan larutan penghenti berupa SDS 10% dalam HCl 0,1 N ke dalam setiap sumuran. Plate ditutup menggunakan aluminium foil untuk menghindari paparan cahaya, dan dibiarkan pada suhu ruang selama 24 jam. Plate ditutup menggunakan aluminium foil untuk menghindari paparan cahaya, dan dibiarkan pada suhu ruang selama 24 jam lalu diukur menggunakan microplate reader pada panjang gelombang 595 nm untuk melihat absorbansi sel hidup

Analisis Nilai IC₅₀

Aktivitas sitotoksik dapat diinterpretasikan melalui nilai IC₅₀ (konsentrasi sampel yang efektif untuk 50% dari populasi sel telah lisis) dengan analisis menggunakan fitur probit pada *software* SPSS 22 [11].

Pemacuan Apoptosis dengan Flow Sitometri

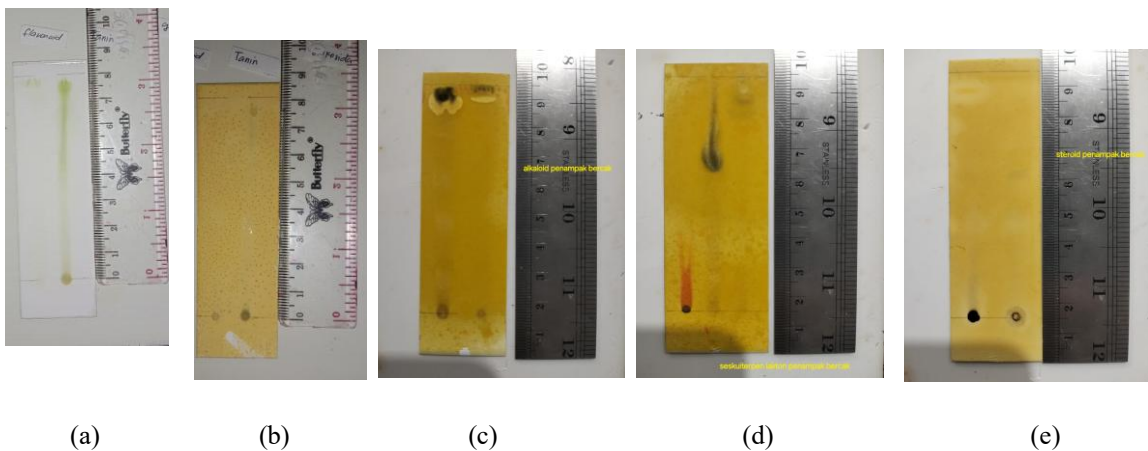
Sel (5x10⁵ sel/sumuran) dimasukkan pada sumuran yaitu 6 sumuran lalu diinkubasi terlebih dahulu selama 24 jam. Setelah itu dimasukkan larutan uji dan diinkubasi kembali selama 48 jam, dipanen sel dengan menambahkan tripsin 0,025% dan lalu dimasukkan kedalam tabung konikel dan sel dicuci dua kali menggunakan 1 ml PBS lalu disentrifugasi selama 5 menit. Supernatan dibuang dan endapannya dikumpulkan lalu diresuspensi dalam PBS dan di sentrifugasi selama 3 menit lalu dibuang supernatan dan endapan diberi larutan Annexin V + PI (apoptosis didiamkan selama 10 menit ditempat yang gelap pada suhu 37°C. Sampel dianalisa menggunakan alat flow sitometer FACScan [12-14].

3. HASIL

Pada pembuatan ekstrak dengan metode refluks didapatkan hasil ekstrak kental dan dilanjutkan dengan fraksinasi dengan beberapa pelarut sesuai dengan tingkat kepolarannya dimulai dari yang non-polar, semi polar lalu polar. Hasil identifikasi senyawa metabolit sekunder pada tanaman *Vernonia amygdalina* Del. dengan metode KLT (Kromatografi Lapis Tipis) dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Hasil Identifikasi Senyawa dengan metode KLT

Senyawa	Nilai Rf Ekstrak Metanol	Nilai Rf Fraksi Kloroform
	Daun Afrika	Daun Afrika
Alkaloid	0,37	-
Glikosida	0,15	-
Flavonoid	0,31	0,52
Steroid/Terpenoid	0,34	0,67
Tannin	0,25	-
Seskuiterpen Lakton	0,18	0,62



Gambar 1. Visualisasi hasil KLT setelah disemprot penampak bercak (a) Flavonoid; (b) Tannin; (c) Alkaloid; (d) Seskuiterpen Lakton; (e) Steroid/Terpenoid


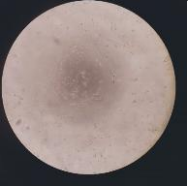

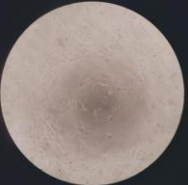
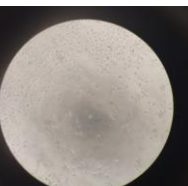
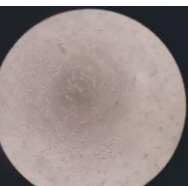


Berdasarkan hasil identifikasi senyawa metabolit sekunder pada ekstrak dan fraksi kloroform daun Afrika yang menunjukkan positif mengandung senyawa seskuiterpen lakton yang memiliki potensi antikanker sehingga dilakukan uji sitotoksik untuk membuktikan potensi antikanker tersebut. Pada pengujian sitotoksik sel didapatkan hasil pada table berikut.

Tabel 2. Tabel Hasil Uji Sitotoksik

Sample	IC ₅₀ ± SD	Aktivitas Antikanker
Ekstrak Metanol Daun Afrika	344.37±25.12	Aktif Lemah
Fraksi N-Heksana Daun Afrika	187.33±12.48	Aktif Lemah
Fraksi Kloroform Daun Afrika	81.80±4.18	Aktif Sedang
Fraksi Etil Asetat Daun Afrika	204.35±8.39	Aktif Lemah
Fraksi Sisa Daun Afrika	4032.38±921.22	Tidak Aktif
Doksorubisin	0,29 ± 0,01	Aktif Kuat

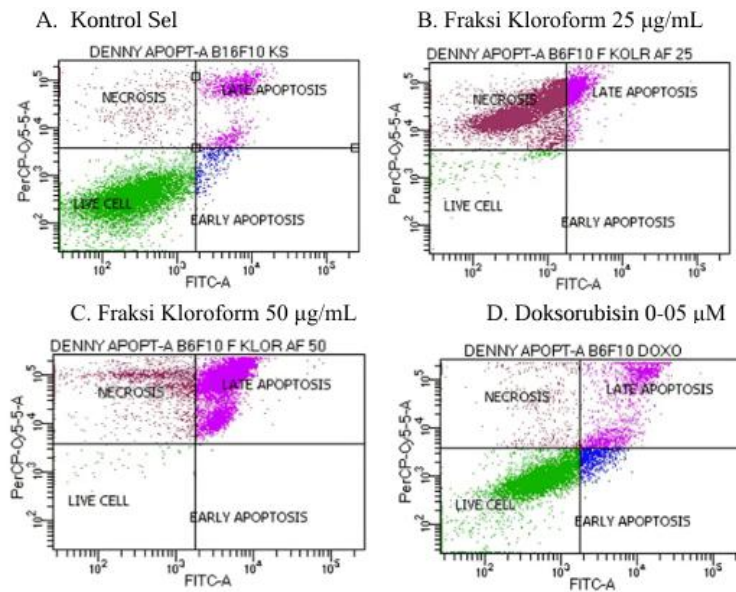
Pengamatan pada morfologi sel pada 24 jam setelah perlakuan juga dapat mendukung data viabilitas sel. Hasil pengamatan morfologi dapat dilihat pada **Tabel 3** yaitu adanya perbedaan yang jelas antara dosis terendah dan dosis tertinggi pada setiap sampel. Pada dosis terendah, sel masih tampak menyebar dengan bentuk relatif normal dan kepadatan sel yang tinggi, menunjukkan viabilitas sel yang masih baik. Sebaliknya, pada dosis tertinggi terjadi perubahan morfologi yang signifikan, ditandai dengan berkurangnya jumlah sel, perubahan bentuk sel menjadi lebih bulat, serta adanya indikasi kerusakan sel atau kematian sel (apoptosis/nekrosis), yang merupakan karakteristik umum sel yang mengalami proses kematian terprogram seperti penyusutan sel, perubahan bentuk, dan gangguan integritas membran [15].

Tabel 3. Morfologi Sel B16F10 24 jam setelah perlakuan

Sampel	Dosis Terendah	Dosis Tertinggi
Ekstrak Metanol		
Fraksi N-Heksana		
Fraksi Kloroform		
Doksorubisin		

Kematian sel sangat jelas terlihat pada fraksi kloroform dan kontrol positif doksorubisin, yang menunjukkan penurunan kepadatan sel dan perubahan morfologi yang lebih nyata dibandingkan ekstrak metanol dan fraksi n-heksana. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan dosis berbanding lurus dengan peningkatan efek sitotoksik terhadap sel B16F10, sejalan dengan mekanisme kematian sel akibat induksi sitotoksik dan aktivasi jalur apoptosis [16].

Pemacuan apoptosis sel dilakukan menggunakan flow sitometri untuk melihat kematian sel yang menunjukkan proses seluler yang teratur dan terorkestrasi, yang dapat terjadi baik dalam kondisi fisik maupun patologis pada berbagai jenis penyakit. Mekanisme apoptosis menjadi salah satu target utama dalam pengembangan strategi terapi kanker dengan berbagai cara diantaranya adalah peningkatan ROS intraseluler dan penekanan ekspresi keluarga protein NF-KB [17].



Gambar 2. Hasil apoptosis pada sel B16F10, (A) kontrol sel B16F10, (B) fraksi kloroform daun afrika 25 µg/mL, (C) fraksi kloroform daun afrika 50 µg/mL (D) doxorubicin 0-05 µM

Berdasarkan hasil apoptosis pada **Gambar 2**, perlakuan fraksi kloroform daun afrika menunjukkan adanya peningkatan jumlah sel yang mengalami apoptosis dibandingkan kontrol. Pada konsentrasi 25 µg/mL, peningkatan mulai terlihat terutama pada apoptosis awal. Peningkatan ini menjadi lebih jelas pada konsentrasi 50 µg/mL, dengan bertambahnya sel pada fase apoptosis lanjut. Sementara itu, doksorubicin sebagai kontrol positif menunjukkan efek induksi apoptosis yang lebih kuat. Hasil ini menunjukkan bahwa fraksi kloroform daun afrika memiliki potensi sitotoksik melalui mekanisme induksi apoptosis pada sel B16F10.

4. PEMBAHASAN

Rendemen ekstrak metanol daun afrika cukup besar dikarenakan metode refluks pada ekstraksi yang merupakan ekstraksi panas. Pemanasan menyebabkan pecahnya dinding sel tanaman. Proses ekstraksi lebih cepat dan tingginya suhu mengakibatkan pergerakan molekul dan pergerakan pelarut lebih cepat. Kondisi inilah yang membuat kontak antara zat aktif dan pelarut semakin intensif sehingga hasil ekstraksi yang didapatkan lebih banyak dibandingkan metode ekstraksi dingin (tanpa pemanasan). Adapun faktor-faktor yang mempengaruhi hasil ekstraksi antara lain jenis pelarut, jumlah pelarut, suhu, waktu ekstraksi, dan metode ekstraksi yang digunakan [18,19].

Untuk mengidentifikasi senyawa yang terkandung dalam ekstrak metanol dan fraksi daun afrika dilakukan uji kromatografi lapis tipis. plat KLT sebagai fase diam yang berupa silika gel yang bersifat polar dan dilakukan penjuanan untuk mendapatkan homogenitas dalam bejana dan meminimalisir pelarut yang menguap dari plat KLT. Setelah jenuh dilanjutkan penotolan sampel pada fase diam (plat KLT) lalu dimasukkan kedalam *chamber*. Setelah sampai ke batas atas dari plat KLT, maka plat diangkat dan dibiarkan sejenak agar mengering

lalu diamati dibawah sinar UV 254nm dan 366nm. Pada panjang gelombang 254nm dapat dilihat bercak pada plat KLT. Sedangkan UV pada panjang gelombang 366 nm digunakan untuk melihat warna atau bercak yang tidak terlihat pada panjang gelombang 254 nm oleh mata. Bercak yang tampak ditandai dengan penyemprotan larutan penampak bercak lalu dianalisis dan hasil KLT daun afrika terlihat pada **Tabel 1** dan **Gambar 1** yang menunjukkan hasil dari pengujian KLT menunjukkan bahwa fraksi kloroform daun afrika memang memiliki senyawa flavonoid, steroid/terpenoid dan seskuiterpen lakton. Seskuiterpen lakton adalah senyawa utama yang bersifat bioaktif dari hasil isolasi daun Afrika yang merupakan turunan terpenoid yang berpotensi dalam pengobatan antikanker sedangkan ekstrak methanol daun Afrika masih memiliki banyak senyawa seperti alkaloid, tannin, glikosida dan saponin [20].

Berdasarkan hasil identifikasi senyawa yang menunjukkan potensi antikanker, maka dilanjutkan pengujian pada sel kanker melanoma yaitu B16F10 dengan metode MTT. Pada penelitian ini dilakukan pengujian sitotoksik MTT pada fraksi kaya flavonoid daun afrika yaitu fraksi kloroform. Waktu induksi yang dilakukan saat perlakuan oleh senyawa uji adalah 24 jam. Hasil data absorbansi uji sitotoksitas akan dilakukan analisis data untuk menghitung persentase kehidupan sel dan analisis probit untuk menghitung nilai IC_{50} . Dalam penelitian ini didapatkan nilai IC_{50} dari fraksi kloroform daun afrika menjadi larutan uji paling efektif diikuti dengan fraksi n-heksana, fraksi etil asetat lalu ekstrak methanol dengan pembanding doksorubisin.

Berdasarkan hasil uji sitotoksik, aktivitas sitotoksik dapat ditandai dengan melihat perubahan fisik dan % hidup sel B16F10 setelah diinkubasi 24 jam dengan perlakuan. Kematian sel dapat dibuktikan dengan data jumlah sel yang hidup dan perubahan pada morfologi sel. Sel mati tampak bulat, gelap, tidak bercahaya dan membran sel pecah atau agak samar. Suatu ekstrak yang dinyatakan terdapat aktivitas sitotoksik sangat kuat jika nilai IC_{50} di bawah 10 $\mu\text{g/mL}$, kategori sitotoksik kuat jika nilai IC_{50} yaitu 10-100 $\mu\text{g/mL}$, dan kategori sedang jika nilai IC_{50} pada rentang 100-500 $\mu\text{g/mL}$. Semakin kecil nilai IC_{50} berarti semakin kuat efek zat tersebut dalam menghambat pertumbuhan sel kanker [21-23].

Perubahan morfologi sel B16F10 setelah 24 jam perlakuan menunjukkan adanya efek sitotoksik yang dipengaruhi oleh dosis. Pada dosis rendah, sel masih mempertahankan bentuk normal dengan kepadatan yang tinggi, sedangkan pada dosis tinggi terjadi penurunan kepadatan sel disertai perubahan morfologi menjadi lebih bulat dan terlepas dari permukaan. Perubahan ini mengindikasikan terjadinya kematian sel, yang umumnya ditandai dengan penyusutan sel, perubahan bentuk, serta gangguan integritas membran. Hasil ini sesuai dengan literatur yang menyatakan bahwa induksi apoptosis pada sel kanker ditandai dengan perubahan morfologi seperti sel menjadi bulat, kehilangan adhesi, dan berkurangnya jumlah sel. Selain itu, peningkatan efek sitotoksik seiring peningkatan dosis juga berkaitan dengan mekanisme stres oksidatif dan aktivasi jalur apoptosis yang menyebabkan penghentian siklus sel dan kematian sel [15-16].

Efek sitotoksik yang lebih dominan pada fraksi kloroform dibandingkan ekstrak metanol dan fraksi n-heksana menunjukkan bahwa senyawa aktif yang bersifat semipolar kemungkinan berperan lebih besar dalam aktivitas antikanker. Hal ini sejalan dengan laporan bahwa senyawa bioaktif seperti flavonoid dan fenolik dapat menginduksi apoptosis melalui mekanisme stres oksidatif dan modulasi jalur sinyal sel kanker [16].

Secara kimiawi, senyawa terpenoid biasanya larut dalam lemak serta dapat ditemukan pada sitoplasma sel tumbuhan. Umumnya, digunakan petroleum eter untuk mengekstraksi senyawa terpenoid dari jaringan tumbuhan. Sedangkan pelarut eter, benzene, dan kloroform digunakan untuk mengekstraksi diterpene, sterol, triterpenoid, dan seskuiterpen lakton. Sehingga pada penelitian ini kandungan seskuiterpen lakton paling besar ada pada fraksi kloroform yang menjadi penyebab efektivitas sitotoksiknya menjadi lebih tinggi dari sampel uji lainnya. Struktur seskuiterpen terdiri dari 2 isopren sehingga terdiri dari 15 atom karbon sehingga memiliki peran sebagai *building block* yaitu menghambat aktivitas sel akibat beberapa faktor diantaranya gangguan pada elemen penyusun dinding sel yang dapat menghambat kestabilan dari permeabilitas dinding sel dan menghambat sintesis sel yang artinya dapat menghambat sintesis asam nukleat [24].

Fraksi kloroform daun Afrika juga sangat aktif pada sel melanoma B16F10. Perlakuan 25 $\mu\text{g/mL}$ dan 50 $\mu\text{g/mL}$ secara drastis menurunkan viabilitas sel menjadi 2,9% dan 0,6% (dari 81,8% pada kontrol). Kedua konsentrasi fraksi kloroform ini menghasilkan peningkatan apoptosis akhir dan nekrosis yang sangat tinggi. Khususnya pada 25 $\mu\text{g/mL}$, persentase nekrosis mencapai 82,1%, menunjukkan bahwa mekanisme kematian sel yang dominan adalah melalui proses nekrotik. Sebaliknya, doksorubisin 0-05 μM pada sel B16F10 menunjukkan mekanisme yang berbeda, dengan persentase Apoptosis awal yang sangat dominan (72,2%). Fraksi kloroform daun Afrika berpotensi sebagai agen antikanker namun penggunaannya perlu disesuaikan untuk mengutamakan mekanisme

apoptosis dibandingkan nekrosis untuk keamanan terapi sementara doksorubisin tetap efektif sebagai standar apoptosis inducer pada kanker [25].

5. KESIMPULAN

Ekstrak metanol dan fraksi daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Del.) mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder, antara lain flavonoid, steroid/terpenoid, dan seskuiterpen lakton, yang teridentifikasi melalui uji KLT, dengan komposisi senyawa berbeda pada tiap fraksi. Hasil uji sitotoksik metode MTT menunjukkan bahwa fraksi kloroform daun Afrika memiliki aktivitas sitotoksik paling kuat terhadap sel melanoma B16F10 dengan nilai IC₅₀ sebesar 81,80 ± 4,18 µg/mL, termasuk dalam kategori aktif sedang, dibandingkan ekstrak metanol dan fraksi lainnya. Penelitian ini membuktikan bahwa daun *Vernonia amygdalina* Del., khususnya fraksi kloroform, berpotensi dikembangkan sebagai sumber bahan alam kandidat agen antikanker terhadap melanoma, sehingga layak untuk diteliti lebih lanjut pada tingkat mekanisme molekuler dan uji in vivo.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada program studi Sarjana Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara atas dukungan dan fasilitas yang diberikan selama penelitian ini berlangsung dan kepada seluruh pihak yang telah berkontribusi penuh dalam proses penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, et al. Global Cancer Observatory: Indonesia Cancer Today. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2024. Available from: <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/360indonesia-fact-sheet.pdf>
- [2] Falah K. Peran kalsitriol [1,25(OH)2D] dalam regulasi jalur autofagi dan apoptosis pada lini sel melanoma B16-F10 [skripsi]. Bandung: Universitas Padjadjaran; 2024. p. 24–27.
- [3] Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM). Pedoman uji toksisitas praklinik secara in vivo. Jakarta: BPOM; 2022. p. 31
- [4] Azali AS, Rajab MA, Lathifah S, Akrom. Potensi Antioksidan Famili Asteraceae dalam Menangkal Radikal Bebas Asap Rokok: Sebuah Tinjauan. *J Farmasimed*. 2025;8(1):477
- [5] Hasibuan PAZ, Keliat JM, Lubis MF, Nasution A. The ethyl acetate extract of *Vernonia amygdalina* leaf ameliorates gemcitabine effect against migration and invasion of PANC-1 cells via down-regulation of the VEGF, COX2, and RAS/MEK pathways. *Saudi Pharm J*. 2024;32(1):101872
- [6] Harahap U, Hasibuan PAZ, Sembiring R. Aktivitas antibakteri dan antikanker kombinasi ekstrak etil asetat daun Afrika dan agen kemoterapi. *J Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 2021;19(3):210–218.
- [7] Rosalina, V. P. A. Z. Hasibuan, D. Satria, E. Meiyanto, D. P. Putra, et al., "Antioxidant activity of flavonoid rich fraction of (*Vernonia amygdalina* Delile.) leaves," *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2024. 16(4):14-17
- [8] J. Ferlay, M. Ervik, F. Lam, M. Laversanne, M. Colombet, L. Mery, et al., *Global Cancer Observatory: Indonesia Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2024. [Online]. Available: <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/360indonesia-fact-sheet.pdf>. [Accessed: Sep. 25, 2025].
- [9] Kementerian Kesehatan RI. Farmakope Herbal Indonesia. Edisi II. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2017. Halaman 531
- [10] Hasibuan PAZ., D. Munir, D. Pertiwi, D. Satria, and M. F. Lubis, "Flavonoids constituent analysis and cell cycle inhibition activity of ethylacetate extract of *Vernonia amygdalina* Delile leaves on lung cancer cell line," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 2020; 10(3), pp. 135–142
- [11] A. M. Forentin, M. Munir, M. B. Febrian, T. M. Fakhri, R. Y. Utomo, A. Aries, H. Setiawan, A. Fikri, S. Juliyanto, D. Ramadhani, R. A. Susidarti, M. Ikawati, M. Syaifudin, and E. Meiyanto, "A dual approach to cancer therapy and diagnosis: In vitro, in vivo, and in silico study of 131I-labeled pentagamavunon-0," *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 2025; 334, pp. 3393–3407.
- [12] Dalimunthe A, Hasibuan PAZ, Silalahi J, Sinaga SF, Satria D. Antioxidant activity of alkaloid compounds from *Litsea cubeba* Lour. *Orient J Chem*. 2018;34(2):1149–1152
- [13] Hasibuan PAZ, Keliat JM, Lubis MF. Combination of cisplatin and ethyl acetate extract of *Vernonia amygdalina* Delile induces cell cycle arrest and apoptosis on PANC-1 cells via PI3K/mTOR. *J Pharm Pharmacogn Res*. 2024;12(5):870–880

- [14] Hasibuan PAZ, Munir D, Pertiwi D, Satria D, Lubis MF. Flavonoid constituent analysis and cell cycle inhibition activity of ethylacetate extract of *Vernonia amygdalina* Delile leaves on lung cancer cell line. *J Pharm Biomed Sci.* 2020;10(3):135–142.
- [15] M. Mustafa, R. Ahmad, I. Q. Tantry, W. Ahmad, S. Siddiqui, M. Alam, K. Abbas, Moinuddin, M. I. Hassan, S. Habib, and S. Islam, “Apoptosis: A Comprehensive Overview of Signaling Pathways, Morphological Changes, and Physiological Significance and Therapeutic Implications,” *Cells*, vol. 13, no. 22, p. 1838, Nov. 2024, doi: 10.3390/cells13221838
- [16] R. Lateef, Marhaba, S. Anjum, K. M. Ansari, I. Ahmad, N. Lohia, H. A. Alhadlaq, M. J. Akhtar, and M. Ahamed, “NiO@rGO nanohybrids triggered cytotoxicity via oxidative stress, cell cycle arrest, and apoptosis pathways,” *Scientific Reports*, 2026; 15 (21966).
- [17] Haryanti S, Pramono S, Murwanti R, Meiyanto E. The synergistic effect of doxorubicin and ethanolic extracts of *Caesalpinia sappan* L. wood and *Ficus septica* Burm. f. leaves on viability, cell cycle progression, and apoptosis induction of MCF-7 cells. *Indones J Biotechnol.* 2016;21(1):29–37.
- [18] Pawarti N, Iqbal M, Ramdini DA, Yuliyanda C. Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Porsen Rendemen dan Kadar Fenolik Ekstrak Tanaman yang Berpotensi sebagai Antioksidan. *Medula.* 2023;4(1):591-592
- [19] Farrel R, Aulawi, T, Darmawi, A. Analisis Mutu Simplisia Rimpang Jahe Merah (*Zingiber officinale* Var. *Rubrum*) dengan Suhu Pengeringan yang Berbeda. *J Pertanian Tropik.* 2020;7(1):138
- [20] Harahap FA, Yulandari M, Asshiddiqi MH, Putri H, Tanaka G, Anggiani I, Sianipar P, Gustianingsih. Skrining Fitokimia dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Tanin Secara Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Etanol Daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Del.). *J Kesehatan Unggul Gemilang.* 2024;8(1): 13
- [21] Amin, A., Waris, R., Kurnia, N., dan Fadilla, N. Identifikasi Farmakognostik Dan Parameter Mutu Spesifik Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jameicensis*) Asal Kabupaten Enrekang Sulawesi Selatan. *Jurnal Farmasimed.* 2025;7(2):225
- [22] Hasnawati H, Wahyuono S, Susidarti RA, Santosa D, Arfan A. A new diterpenoid of Indonesian *Scoparia dulcis* Linn: isolation and cytotoxic activity against MCF-7 and T47D cell lines. *Molecules.* 2023;28(16):5960.
- [23] Njanpa CN, Kamtchoung P, Wogu E. Antitumor activity of *Vernonia amygdalina* ethyl acetate fraction in B16F10 melanoma xenograft model. *Phytother Res.* 2023;37(4):1567–1578.
- [24] Yadav N, Yadav R, Goyal A. Chemistry of terpenoid. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2014;27(2):272–277
- [25] Alshehade SA, Almoustafa HA, Alshawsh MA, Chik Z. Flow cytometry-based quantitative analysis of cellular protein expression in apoptosis subpopulations: A protocol. *Heliyon.* 2024;10(1):7