

EFEK SITOTOKSISITAS DAN
SELEKTIVITAS FRAKSI AKTIF
EKSTRAK DAUN KELOR
(Moringa oleifera Lamk.)
TERHADAP SEL KANKER
PAYUDARA T47D

by Susilowati Susilowati

Submission date: 07-Jun-2023 01:41PM (UTC-0400)

Submission ID: 2111180455

File name: Susilowati_dan_Truly_Dian_Anggraini-2018-Farmasains.pdf (976.67K)

Word count: 4696

Character count: 26617

EFEK SITOTOKSISITAS DAN SELEKTIVITAS FRAKSI AKTIF EKSTRAK DAUN KELOR (*Moringa oleifera* Lamk.) TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D

CYTOTOXICITY AND SELECTIVITY EFFECTS OF ACTIVE FRACTION FROM MORINGA LEAF EXTRACTS ON BREAST CANCER CELLS T47D

¹Susilowati dan ²Truly Dian Anggraini
^{1,2}DIII Farmasi, STIKES Nasional, Surakarta

Naskah diterima tanggal 20 September 2018

ABSTRACT

Previous studies showed that Moringa leaf extract and its fractions contained flavonoids and phenolics which have the potential as antioxidants. Antioxidants are known to have the ability to reduce free radicals which is one of the causes of protein and DNA damage resulting in cancer. In this study, the potential of breast anticancer in Moringa leaf was carried out through cytotoxic tests on T47D breast cancer cells and the safety potential through selectivity to normal cells in vitro. The first step of this research included the making of Moringa leaf thick extract with maceration method using methanol solvent and continued with fractionation to obtain the water fraction and ethyl acetate fraction. The second step was carried out Cytotoxic test of Moringa leaf fraction on T47D cells and Vero cells. Data analysis carried out included analysis of anticancer breast potential through IC_{50} values from cytotoxic tests and safety analysis through the Selectivity Index (SI). The results showed that cytotoxic activity of Moringa leaf ethyl acetate fraction could inhibit T47D cell growth better than the water fraction. Both fractions showed low cytotoxic effects and selectivity for T47D cells with IC_{50} values 499.42 μ g/mL for ethyl acetate fraction and 289.47 μ g/mL water fraction with Selectivity Index values were 0.77 and 1.01 respectively.

Keywords : *Moringa leaves fraction, Cytotoxicity of breast cancer, Selectivity*

ABSTRAK

Penelitian sebelumnya menunjukkan ekstrak daun kelor dan fraksinya memiliki kandungan flavonoid dan fenolik yang memiliki potensi sebagai antioksidan. Antioksidan diketahui memiliki kemampuan untuk mereduksi radikal bebas yang merupakan salah satu penyebab kerusakan protein dan DNA sehingga mengakibatkan timbulnya kanker. Pada penelitian ini potensi antikanker payudara daun kelor dilakukan melalui uji sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dan potensi keamanan melalui selektivitasnya terhadap sel normal secara *in vitro*. Tahap pertama penelitian ini meliputi pembuatan ekstrak kental daun kelor dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol dan dilanjutkan dengan fraksinasi hingga diperoleh fraksi air dan fraksi etil asetat. Tahap kedua dilakukan uji Sitotoksik ekstrak dan fraksi daun kelor terhadap Sel T47D dan Sel Vero. Analisis data yang dilakukan meliputi analisis potensi antikanker payudara melalui nilai IC_{50} dari uji sitotoksik dan analisis keamanannya melalui *Selectivity Index (SI)*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas sitotoksik fraksi etil asetat daun kelor dapat menghambat pertumbuhan sel T47D lebih baik dibandingkan dengan fraksi airnya. Kedua fraksi daun kelor memiliki efek sitotoksik dan selektivitas yang rendah terhadap sel T47D dengan nilai IC_{50} fraksi air 499,42 μ g/mL dan fraksi etil asetat 289,47 μ g/mL serta nilai *Selectivity Index* secara berurutan 0,77 dan 1,01.

Kata kunci: fraksi daun kelor, sitotoksisitas kanker payudara, selektivitas

PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan jenis kanker dengan insidensi dan penyebab kematian paling tinggi di dunia. Berdasarkan hasil riset dari 184 negara pada tahun 2008, kanker payudara menjadi kanker dengan prevalensi paling tinggi yakni di 145 negara pada wanita dan bila digabungkan antara wanita dan laki-laki menunjukkan di 112 negara (Bray dkk., 2013). Pada tahun 2015 menunjukkan 16% dari semua

kematian di dunia disebabkan akibat kanker (WHO, 2017). Sementara itu, sejak tahun 2008 hingga 2012 insidensi kanker payudara mengalami peningkatan lebih dari 20% dengan peningkatan kematian akibat kanker payudara mencapai 14% (WHO, 2013). Berdasarkan data Oemiat, dkk (2011) menunjukkan prevalensi kanker payudara di Indonesia menempati urutan kedua setelah kanker serviks.

Doksorubisin merupakan obat kemoterapi yang paling umum digunakan untuk pengobatan kanker payudara, tetapi banyak

Alamat korespondensi :
abisalumisri@gmail.com

mekanisme molekuler yang berkontribusi pada perkembangan obat tersebut (ACS, 2014;

Rajkumar dan Yamuna, 2008). Selain resistensi yang ditimbulkan, obat tersebut juga memiliki efek samping kardi toksik melalui peningkatan produksi oksidan pada jantung dan disfungsi mitokondria (Green dan Leeuwenburgh, 2002). Berdasarkan hal tersebut, penelitian dan pengembangan obat kanker menjadi sangat penting untuk terus dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan agen kemoterapi yang selektif dengan resistensi dan efek samping yang minimal.

Salah satu tanaman Indonesia yang dieksplorasi dalam rangka penelitian dan pengembangan obat kanker adalah daun kelor. Penelitian yang telah dilakukan Shahrir (2012) menunjukkan ekstrak etanol dan metanol daun kelor mengandung flavonoid sebesar 143,958 mg/gram dan 137,831 mg/gram dan fenolik sebesar 122,770 mg/gram dan 127,049 mg/gram. Tingginya keberadaan senyawa fenolik dan flavonoid dalam daun kelor tersebut terbukti berbanding lurus dengan tingginya potensi antioksidan. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Shahrir (2012) menunjukkan ekstrak etanol dan metanol daun kelor memiliki potensi antioksidan yang kuat dengan nilai IC_{50} 62,09 μ g/mL dan 68,321 μ g/mL. Selain itu, hasil penelitian Erika, dkk (2014) menunjukkan fraksi etil asetat ekstrak daun kelor memiliki kemampuan menangkap radikal bebas DPPH sangat kuat dengan nilai IC_{50} sebesar 6,59 μ g/mL. Penelitian tersebut didukung oleh penelitian yang menunjukkan fraksi etil asetat dari ekstrak metanol daun kelor memiliki presentase penghambatan radikal bebas yang tinggi yaitu sebesar 92,12% dan pada fase air memiliki persentase penghambatannya sebesar 86,6% (Fitriana, dkk, 2015).

Tingginya potensi antioksidan pada daun kelor menunjukkan daun kelor dapat dikembangkan sebagai agen antikanker. Hal tersebut dikarenakan antioksidan diketahui memiliki kemampuan untuk mereduksi dan meredam radikal bebas yang merupakan spesies tidak stabil dengan elektron yang tidak berpasangan dan dapat merusak sel-sel manusia akibat kondisi oksidasi. Kondisi oksidasi tersebut dapat menyebabkan kerusakan protein dan DNA yang merupakan penyebab timbulnya kanker (Ozyurt *et al.* 2006). Potensi antikanker daun kelor dibuktikan melalui penelitian Hermawan, dkk (2012) yang menunjukkan ekstrak daun kelor terbukti dapat meningkatkan efek sitotoksik dari doksorubisin terhadap sel kanker Hela. Selain itu, ekstrak metanol daun kelor berpotensi sebagai antikanker kolon tikus Wistar yang diinduksi DMBA dengan dosis efektif sebesar 20mg/kgBB/hari (Endang dan Sukma, 2016).

Potensi antikanker dari ekstrak daun kelor tersebut mendukung untuk dilakukannya pengujian potensi antikanker payudara pada ekstrak metanol (fraksi air dan etil asetat) daun kelor yang terbukti berpotensi aktif sebagai antioksidan. Pada penelitian ini potensi antikanker payudara daun kelor dilakukan melalui uji sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dan potensi keamanan melalui selektivitasnya terhadap sel normal secara *in vitro*.

METODE PENELITIAN

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain bejana maserasi, *rotary evaporator* (Heidolph, Jerman), penangas air, sonikator (Selecta, Barcelona), mesin pembuat serbuk, alat-alat gelas, neraca analitik (Shimadzu, tipe LS-6DT), mikropipet (0,5-10 μ l) (Soccorec, Swiss), kertas saring, *thermostat incubator*, 96 *well-plate*, *ependorf tube*, *cover slip*, *yellow dan blue tip*, *Laminar Air Flow Cabinet*, mikroskop cahaya (Nikon YS 100, Jepang), *ELISA reader* (Bio-Rad microplate reader Benchmark serial no. 11565, Jepang), kamera digital (Sony Cybershot).

Bahan

Bahan dalam penelitian ini adalah daun kelor yang dipanen di desa Ngawen Ombo, Kecamatan Kunduran, Kabupaten Blora. Pelarut yang digunakan adalah etanol 70% v/v teknik, etanol 96% v/v teknik, air suling, *n*-heksan teknik, metanol, dan etil asetat p.a (Merck, Jerman). Sel kanker payudara T47 dan sel Vero diperoleh dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Media yang digunakan yaitu media penumbuh DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) (Gibco) yang mengandung *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% v/v (Gibco) dan penisillin-streptomisin 1 % v/v (Gibco), PBS (*Phosphate buffer Saline*), Tripsin-EDTA 2,5 %, SDS 10%, Pelarut DMSO (Sigma), 100X *Stock Solution* yang mengandung 50 mg *etidium bromide* (Sigma) dan 15 mg akrinin oranye (Sigma) yang dilarutkan dalam 1 ml etanol 70% (Merck) dan selanjutnya ditambah akuades 49 ml, 1x *Working Solution* yang mengandung 1 ml 100X *Stock solution* yang diencerkan menjadi 1/100 dalam *Phosphat Buffer Saline* (PBS), Formalin (Merck), dan akuades.

Metode

Penelitian dilakukan melalui beberapa tahapan. Tahap pertama pembuatan ekstrak metanol daun kelor meliputi persiapan sampel, ekstraksi dan dilanjutkan dengan partisi sampel. Tahap kedua dilakukan uji Sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dan uji keamanannya terhadap sel Vero. Secara skematis tahapan dilakukan dengan alur seperti pada gambar 1.

1. Tahap pertama

Tahapan pertama pembuatan ekstrak daun kelor dan dilanjutkan dengan fraksinasi untuk memperoleh fraksi air dan etil asetat.

a. Persiapan sampel/ Pembuatan Simplisia

Daun kelor dipetik dan disortir basah untuk memisahkan dari daun yang kurang baik. Selanjutnya daun dicuci dengan air, ditiriskan dan diangin-anginkan semalam. Selanjutnya dioven pada suhu 50°C hingga mudah diremuk. Simplisia kemudian diserbuk dengan alat penggiling.

b. Ekstraksi

Sebanyak 1 kg serbuk daun kelor diekstraksi dengan metanol sebanyak 10 L (1:10 b/v). Volume etanol pada penyarian pertama adalah 5 L (1:5 b/v). Keesokan harinya dilakukan penyaringan terhadap campuran serbuk dan pelarut menggunakan kain flanel berwarna putih. Maserat yang diperoleh segera ditampung dan selanjutnya serbuk dimasukkan kembali ke dalam bejana untuk dilakukan remaserasi. Remaserasi pertama menggunakan metanol sebanyak 2,5 L (1:2,5 b/v). Pada hari ketiga campuran disaring dengan kain mori lalu sari ditampung. Setelah itu serbuk dimasukkan kembali ke dalam bejana maserasi untuk dilakukan remaserasi kedua menggunakan metanol 2,5 L (1:2,5 b/v).

Campuran diaduk satu kali selama masing-masing 15 menit tiap 24 jam. Pada hari terakhir, maserat yang diperoleh dari remaserasi kedua digabung bersama dengan maserat yang diperoleh dari maserasi dan remaserasi pertama. Maserat dikumpulkan dan ekstrak larut metanol selesai dibuat. Ekstrak larut metanol yang diperoleh kemudian diuapkan pada *Rotary evaporator* hingga kurang lebih 200 mL. Selanjutnya dipindahkan ke cawan porselen lalu diuapkan menggunakan penangas air hingga diperoleh ekstrak metanol yang kental.

c. Partisi sampel

Ekstrak pekat (500,0 g) dipisahkan lebih lanjut dengan ekstraksi cair-cair. Ekstrak pekat dilarutkan dalam MeOH:H₂O (3:2), kemudian dipartisi berulang dengan *n*-heksana (1 L) secara bertahap. Hasil yang diperoleh yaitu fase *n*-heksana dan fase air. Fase air dipartisi cair-cair lebih lanjut dengan pelarut etil asetat dan ditambah dengan H₂O. Hasil dari partisi diperoleh fraksi etil asetat dan fraksi air. fraksi tersebut selanjutnya disaring dan diuapkan hingga kering untuk diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel T47-D dan uji keamanannya terhadap sel Vero.

2. Tahap kedua

Tahapan kedua dilakukan pengujian sitotoksik dan uji keamanan. Uji sitotoksik ini mengacu pada Standar Operasional Prosedur oleh CCRC (*Chemopreventive Curcumin Research Center*) Universitas Gadjah Mada.

a. Uji Sitotoksik Ekstrak dan Fraksi terhadap Sel T47D dan Sel Vero

Pengujian sitotoksik dilakukan terhadap Ekstrak metanol, fraksi etil asetat dan fraksi air. Pengujian sitotoksik dari fraksi ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran UGM. Sel dalam kondisi 80% konfluen untuk dipanen diambil dari inkubator CO₂. Jumlah sel dihitung dan dibuat pengenceran sel dengan medium komplit. Sel ditransfer ke dalam sumuran, masing-masing 100 µL. Setiap kali mengisi 12 sumuran, sel diresuspensi agar tetap homogen. Keadaan sel diamati dengan mikroskop *inverted* untuk melihat distribusi sel.

Sel diinkubasi dalam inkubator CO₂ selama semalam (agar sel pulih kembali setelah panen). Perlakuan sel dengan sampel dilakukan setelah sel kembali dalam keadaan normal. Setelah sel normal kembali, dibuat seri konsentrasi sampel untuk perlakuan (termasuk kontrol sel dan kontrol media). *Plate* yang telah berisi sel, diambil dari inkubator CO₂, kemudian media sel dibuang. Seri konsentrasi sampel dimasukkan ke dalam sumuran (triplo) dan diinkubasi di dalam inkubator CO₂. Lama inkubasi tergantung pada efek perlakuan terhadap sel. Jika dalam waktu 24 jam belum terlihat efek sitotoksik, inkubasi dilakukan kembali selama 24 jam (waktu total inkubasi 24-48 jam).

Reagen MTT disiapkan untuk perlakuan (0,5 mg/ml) dengan cara mengambil 1,0 ml stok MTT dalam PBS (5mg/ml), diencerkan dengan medium komplit sampai 10,0 ml. Media sel dibuang lalu ditambahkan 100 µl reagen MTT ke setiap sumuran. Sel diinkubasi selama 4 jam di dalam inkubator CO₂. Inkubasi dilakukan sampai terbentuk formazan. Kondisi sel diperiksa dengan mikroskop *inverted*. Jika formazan telah jelas terbentuk, ditambahkan *reagen stopper* 100 µl SDS 10% dalam HCl 0,1 N. *Plate* dibungkus aluminium foil dan diinkubasi di tempat gelap pada temperatur kamar selama semalam. Absorbansi masing-masing sumuran dibaca dengan *plate reader* pada panjang gelombang 595 nm.

Analisa Data

1. Analisis nilai IC₅₀ (*Inhibitory Concentration 50*) Uji Sitotoksik

Data absorbansi yang diperoleh dari uji sitotoksik dikonversikan ke dalam bentuk persentase viabilitas sel yang dihitung menggunakan persamaan 1:

$$\% = \frac{(\text{absorbansi perlakuan} - \text{absorbansi media})}{(\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi media})} \times 100\%$$

Data yang berupa viabilitas sel kemudian dianalisis dengan program *Microsoft*

Excell 2010 untuk mendapatkan persamaan regresi linear dan nilai linearitas (r) antara konsentrasi versus persentase sel yang hidup/viable dan selanjutnya digunakan untuk menghitung nilai IC_{50} sampel seperti pada persamaan 2:

$$Y = Bx + A$$

Keterangan :

Y = Persentase sel hidup

X = Konsentrasi (ppm)

A = *Intersept*

B = *Slope*

1. Analisis *Selectivity Index (SI)*

Nilai IC_{50} masing – masing sampel yang diperoleh dari perlakuan sampel terhadap kanker (sel T47D) dan sel normal (sel Vero) digunakan untuk menentukan nilai *SI* menggunakan Persamaan 3:

Menurut (Bezivin dkk., 2003), suatu senyawa dikatakan selektif membunuh sel kanker dibandingkan sel normal vero bila memiliki nilai $SI > 3$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil persiapan sampel uji

Daun kelor segar yang telah dikumpulkan kemudian disortasi basah dengan tujuan untuk memisahkan antara daun dan batangnya serta untuk menghilangkan bagian daun yang tidak diinginkan, misalnya bagian daun yang sobek, bagian daun yang ada titik-titik putih pada bagian tengah. Daun kelor yang telah disortasi basah kemudian dicuci dengan air mengalir, hal ini bertujuan untuk menghilangkan kotoran-kotoran yang menempel pada daun dan untuk mengurangi jumlah mikroorganisme. Daun kelor di oven pada suhu 50°C dengan tujuan untuk mendapatkan sampel yang tidak mudah rusak sehingga dapat disimpan dalam waktu lama, mengurangi kadar air dan menghilangkan reaksi enzimatis, sehingga dapat mencegah penurunan mutu atau kerusakan sampel oleh air. Setelah kering, daun kelor diserbuk bertujuan untuk memperkecil ukuran sehingga diharapkan proses penyarian yang dilakukan dapat terjadi

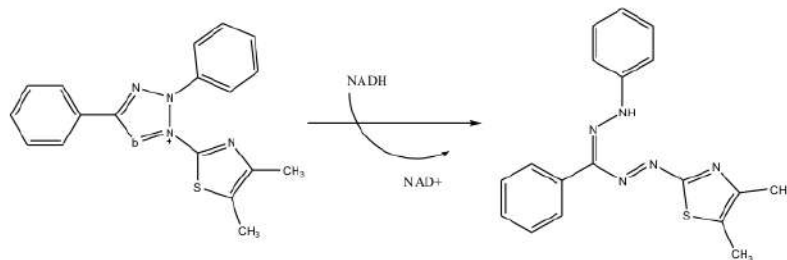
secara maksimal. Semakin kecil ukuran partikel sampel semakin luas permukaannya sehingga kontak antara sampel dengan cairan penyarian akan lebih maksimal dan senyawa aktif yang tersari akan semakin banyak.

Penyarian pada penelitian ini dilakukan dengan cara remaserasi dengan pelarut metanol sehingga diperoleh ekstrak kental. Selanjutnya ekstrak kental dilarutkan dengan menggunakan air:metanol (2:3) diaduk kuat hingga semua ekstrak larut. Kemudian di fraksinasi dengan pelarut *n*-heksan hingga terbentuk dua lapisan. Fase air difraksinasi lagi dengan menggunakan pelarut etil asetat. Kemudian masing-masing fraksi diuapkan dan dipekatkan di atas penangas air hingga diperoleh fraksi kering. Tujuan dari fraksinasi ini adalah untuk memisahkan senyawa berdasarkan polaritasnya, sehingga digunakan pelarut yang memiliki polaritas yang berbeda. Berdasarkan hasil penelitian diperoleh rendemen terhadap simplisia sebesar untuk ekstrak metanol daun kelor sebesar 20,88% (b/b), Fraksi etil asetat 1,67% (b/b) dan fraksi air sebesar 12,73% (b/b). Selanjutnya fraksi etil asetat dan fraksi air tersebut digunakan sebagai sampel uji terhadap sel kanker payudara T47D dan sel Vero untuk mengetahui potensi antikanker dan keamanannya secara in Vitro.

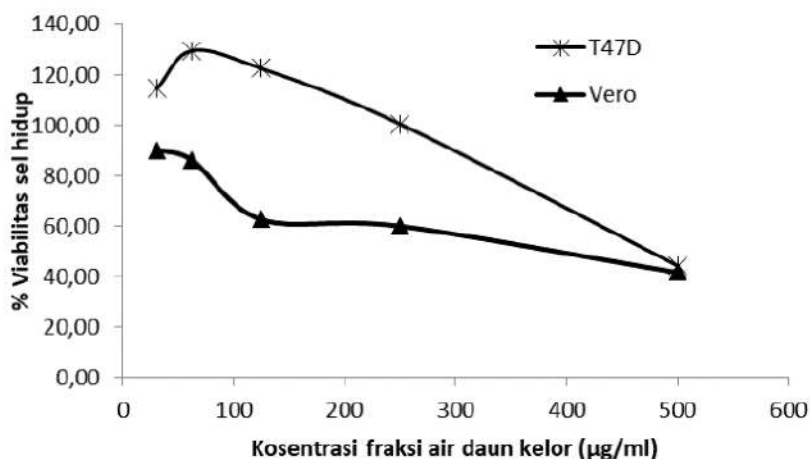
Hasil Uji Sitotoksik Fraksi Air dan Fraksi etil asetat terhadap Sel T47D dan Sel Vero

Uji sitotoksitas dilakukan untuk mengetahui efek sitotoksik fraksi air dan fraksi etil asetat terhadap sel kanker payudara sel T47D dan pengaruhnya terhadap sel Vero menggunakan metode MTT. MTT [3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida] adalah senyawa berwarna kuning dan akan direduksi oleh enzim suksinat dehidrogenasi dalam mitokondria sel hidup menjadi kristal formazan yang berwarna biru magenta (Gambar 1) (Rode, 2008). Selanjutnya dilakukan pemberian reagen *stopper* yang akan melisiskan membran sel dan melarutkan garam formazan tersebut. Garam formazan yang terbentuk diukur dalam bentuk absorbansi.

Semakin tinggi absorbansi, semakin



Gambar 1. Reaksi pembentukan kristal formazan (Rode, 2008)



Gambar 2. Efek fraksi air terhadap sel kanker payudara dan sel normal

banyak sel yang hidup (viabilitas sel tinggi). Senyawa-senyawa sitotoksik akan merusak, memecah atau mematikan sel sehingga mengurangi jumlah formazan yang terbentuk sehingga viabilitas sel akan menjadi rendah. Efek sitotoksik fraksi air dan fraksi etil asetat dapat diketahui dari persentase sel hidup semakin kecil dan mengakibatkan terjadinya perubahan morfologi akibat pemberian sampel uji.

Berdasarkan hasil uji menunjukkan pada fraksi air dan etil asetat daun kelor mengakibatkan penurunan persentase viabilitas sel kanker payudara sel T47D dan sel normal (sel Vero) (Gambar 2 dan Tabel 2). Persentase viabilitas sel mengalami penurunan seiring dengan meningkatnya konsentrasi fraksi yang diberikan. Hasil yang diperoleh ini menunjukkan fenomena *dose dependent* dimana efek toksik meningkat seiring peningkatan konsentrasi yang berarti semakin kecil jumlah sel yang hidup.

Berdasarkan Gambar 2, efek fraksi air berbagai konsentrasi terhadap sel kanker

payudara T47D dan Vero setelah diinkubasi 24 jam mempengaruhi viabilitas sel. Hasil menunjukkan semakin besar konsentrasi fraksi, maka viabilitas sel semakin kecil dengan persentase viabilitas sel paling besar dari fraksi air yang diakibatkan oleh kadar fraksi 62,5µg/mL ($129,64 \pm 0,050\%$). Persentase tersebut menunjukkan efek sitotoksik minimum dari fraksi air terhadap sel T47D. Persentase viabilitas sel paling kecil terdapat pada konsentrasi 500µg/ml ($44,24 \pm 0,031\%$) terhadap sel T47D. Selain itu, fraksi air juga menghasilkan penurunan viabilitas sel vero (sel normal). Efek sitotoksik minimum dari fraksi air terhadap sel Vero diakibatkan oleh kadar fraksi 31,25 µg/mL dengan viabilitas sel hidup $90,00 \pm 0,031\%$. Efek sitotoksik maksimum dari fraksi air terhadap sel Vero pada konsentrasi 500 µg/ml dengan viabilitas sel sebesar $41,87 \pm 0,035\%$.

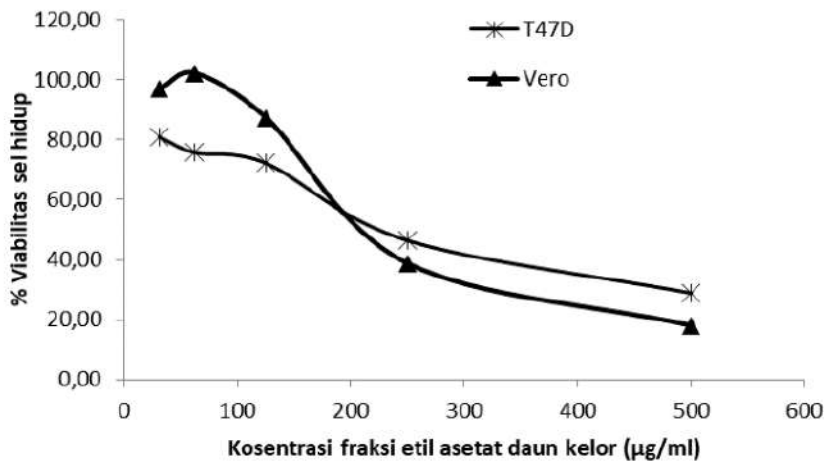
Gambar 3 menunjukkan efek fraksi etil asetat daun kelor berbagai konsentrasi terhadap sel kanker payudara Vero setelah diinkubasi

Tabel 1. Persamaan regresi linier fraksi air terhadap sel T47D dan sel vero

Sel Uji	Persamaan	Nilai IC ₅₀ (µg/mL)	Nilai r hitung	Nilai r table
T47D	$y = -0,114x + 83,00$	499,42	0,977	0,878 (n=5)
Vero	$y = -0,189x + 105,3$	383,02	0,952	

Tabel 2. Persamaan regresi linier fraksi etil asetat terhadap sel T47D dan sel vero

Sel Uji	Persamaan	Nilai IC ₅₀ (µg/mL)	Nilai r hitung	Nilai r table
T47D	$y = -0,171x + 135,4$	289,47	0,953	0,878 (n=5)
Vero	$y = -0,096x + 86,77$	292,59	0,924	



Gambar 3. Efek fraksi etil asetat terhadap sel kanker payudara dan sel vero

24 jam mempengaruhi viabilitas sel. Semakin besar konsentrasi fraksi menunjukkan viabilitas sel semakin kecil. Pada Fraksi etil asetat menunjukkan penurunan persentase viabilitas sel kanker payudara sel T47D dan sel normal (sel Vero). Persentase viabilitas sel paling besar diakibatkan oleh kadar fraksi 31,25 µg/mL dengan persentase viabilitas sel 80,98±0,073% terhadap sel T47D yang menunjukkan efek sitotoksik minimum dari fraksi etil asetat.

Efek sitotoksik maksimum ditunjukkan dengan persentase viabilitas sel paling kecil yang terdapat pada konsentrasi 500 µg/ml dengan persentase viabilitas sel 28,88±0,094% terhadap sel T47D. Selain itu, pada sel vero fraksi etil asetat menunjukkan persentase viabilitas sel paling besar pada konsentrasi 62,5µg/ml dengan viabilitas sel 102,17±0,018%. Persentase tersebut menunjukkan efek sitotoksik minimum dari fraksi etil asetat terhadap sel Vero. Efek sitotoksik maksimum ditunjukkan dari persentase viabilitas sel paling kecil yang terdapat pada konsentrasi 500 µg/ml dengan viabilitas sel sebesar 17,98±0,011 %.

Potensi sitotoksik diketahui melalui nilai IC_{50} , yaitu konsentrasi yang dapat menghambat perkembangbiakan sel sebesar 50% setelah masa inkubasi. Semakin kecil nilai IC_{50} suatu senyawa, maka senyawa tersebut mempunyai efek sitotoksik yang semakin tinggi. IC_{50} diperoleh dari *plotting* terhadap persamaan regresi linier dengan x sebagai konsentrasi sampel dan y adalah persen viabilitas. Semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin poten aktivitas sitotoksik senyawa tersebut dengan kekuatan penghambatan perkembangbiakan sel berbanding lurus dengan konsentrasi senyawa sehingga semakin besar konsentrasi akan semakin banyak pertumbuhan sel yang dihambat. Secara umum, batas IC_{50} yang masih memiliki potensi antiproliferatif

adalah <100 µg/mL(Kamuhabwa dkk., 2000).

Berdasarkan Tabel 1 dan 2 diperoleh nilai IC_{50} dari perlakuan fraksi air dan etil asetat terhadap sel kanker payudara dan sel normal. Nilai IC_{50} tersebut diperoleh dari persamaan kurva regresi linier terhadap masing-masing sel. Berdasarkan persamaan regresi linier tersebut diperoleh nilai r hitung lebih besar dari r tabel, sehingga dari perlakuan menunjukkan hubungan yang linier antara viabilitas sel dan konsentrasi (taraf kepercayaan 95%). Hal ini menunjukkan terdapat korelasi antara konsentrasi fraksi air dengan penghambatan perkembangbiakan sel T47D dan sel Vero dengan taraf kepercayaan 95% ($P=0,05$).

Hasil penelitian menunjukkan efek sitotoksitas fraksi air terhadap sel T47D memiliki nilai IC_{50} 499,42µg/mL dan terhadap sel vero sebesar 383,02 µg/mL, sedangkan sitotoksitas fraksi etil asetat memiliki IC_{50} 289,47 µg/mL terhadap sel T47D dan terhadap sel vero sebesar 292,59µg/mL. Berdasarkan nilai IC_{50} menunjukkan aktivitas sitotoksik fraksi etil asetat daun kelor menunjukkan dapat menghambat pertumbuhan sel T47D lebih baik dibandingkan dengan fraksi airnya tetapi efeknya relative lemah.

Nilai IC_{50} yang diperoleh pada perlakuan fraksi air dan fraksi etil asetat dapat digunakan untuk mengetahui nilai indeks selektivitas. Dari data indeks selektivitas pada gambar 2 dan 3 menunjukkan fraksi air daun kelor dan fraksi etil asetat memiliki nilai indeks selektivitas yang rendah dimana untuk fraksi air sebesar 0,77 dan fraksi etil asetat sebesar 1,01. Suatu senyawa dikatakan selektif membunuh sel kanker dibandingkan sel normal bila memiliki nilai $S/I > 3$ (Bezivin dkk., 2003). Uji sitotoksitas terhadap sel normal bertujuan untuk mengetahui potensi selektivitas sampel uji terhadap sel normal bukan



Gambar 7. Morfologi Sel Uji pada Uji Sitotoksik Metode MTT

Sel sebanyak 10.000 sel/sumuran dalam 96-well plate, diinkubasi selama 24 jam dalam media DMEM Hi-glukos tanpa atau dengan perlakuan sampel. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop *inverted* dengan pembesaran 100x. (KS).kontrol Sel; fraksi air terhadap T47D dan Vero. Morfologi sel yang hidup ditunjukkan dengan gambar panah biru ; dan sel yang mengalami kematian ditunjukkan dengan tanda panah putus-putus.

bertujuan untuk mengevaluasi batas keamanan dan resiko sampel uji. Dalam hal ini selektivitas fraksi air dan fraksi etil asetat ekstrak daun kelor termasuk rendah.

Efek sitotoksik dari fraksi air dan fraksi etil asetat selain dari nilai IC_{50} juga dapat diamati dari perubahan morfologi sel secara mikroskopis. Perubahan morfologi sel terjadi secara signifikan seiring dengan peningkatan konsentrasi fraksi daun kelor. Perbedaan morfologi tersebut dibandingkan dengan kelompok kontrol sel (tanpa perlakuan).

Sel sebanyak 10.000 sel/sumuran dalam 96-well plate, diinkubasi selama 24 jam dalam media DMEM Hi-glukos tanpa atau dengan perlakuan sampel. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop *inverted* dengan pembesaran 100x. (KS).kontrol Sel; fraksi air terhadap T47D dan Vero. Morfologi sel yang hidup ditunjukkan dengan gambar panah biru ; dan sel yang mengalami kematian ditunjukkan dengan tanda panah putus-putus.

Hasil pengamatan pada sel setelah diberi perlakuan menyebabkan perubahan kepadatan sel dan morfologi sel (Gambar 7). Pada perlakuan dengan fraksi air dan fraksi etil asetat pada dosis disekitar IC_{50} menunjukkan kepadatan sel setelah diberi perlakuan relatif lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol sel. Morfologi sel mati fraksi air ataupun etil asetat ditandai dengan pengecilan ukuran sel menjadi titik-titik/bulatan kecil. Sel tanpa perlakuan (kontrol sel) memperlihatkan

morfologi sel T47D yang hidup berbentuk memanjang seperti daun, melekat pada dasar sumuran dan dalam jarak yang saling berdekatan menggambarkan bahwa viabilitas sel yang baik, sedangkan pada sel vero normal setelah panen nampak bulat berinti. Kondisi sel T47D dan sel vero yang mati ditunjukkan oleh panah terputus sel tampak bulat berukuran lebih kecil, tak berinti, berwarna bening dan cenderung tersebar ataupun soliter, karena perlakuan pemberian fraksi setelah inkubasi 24 jam dan diberi larutan MTT.

Sel yang mati tidak dapat terwarnai oleh garam MTT sehingga tidak membentuk warna ungu seperti pada sel hidup. Mitokondria sel mati pada uji sitotoksitas, tidak mampu berespirasi sehingga tidak menghasilkan enzim suksinat reduktase tetrazolium yang dapat mereduksi reagen MTT menjadi produk formazan (CCRC, 2010). Akibatnya pada sel mati tidak terbentuk kristal formazan ungu, tetapi pada sel T47D maupun sel vero yang masih hidup berwarna ungu berinti dan nampak tidak terapung.

Pengukuran viabilitas sel dengan metode MTT pada penelitian ini belum dapat memberikan data yang cukup mengenai mekanisme fraksi air dan etil asetat daun kelor dalam menghambat proliferasi sel T47D. Hal tersebut salah satunya disebabkan oleh keterbatasan metode MTT dalam membedakan kematian sel. Metode MTT tidak dapat membedakan sel mati akibat nekrosis atau apoptosis (ATCC, 2011). Guna mempelajari

mekanisme fraksi daun kelor dalam menghambat proliferasi sel T47D maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut di tingkat molekuler.

KESIMPULAN

Hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa aktivitas sitotoksik fraksi etil asetat daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) dapat menghambat pertumbuhan sel T47D lebih baik dibandingkan dengan fraksi airnya, tetapi keduanya memiliki sitotoksitas yang lemah berdasarkan nilai sitotoksitas fraksi air dan fraksi etil asetat daun kelor terhadap sel kanker payudara T47D yaitu dengan nilai IC_{50} 499,42 μ g/mL dan 289,47 μ g/mL serta nilai *Selectivity Index* secara berurutan adalah 0,77 dan 1,01.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi melalui Hibah Penelitian Dosen Pemula atas dana yang diberikan untuk penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Bezivin, C., Tomasi, S., Lohezic, L.D., Boustie, J., 2003. Cytotoxic Activity of Some Lichen Extracts on Murine and Human Cancer Cell Lines. *Phytomedicine*, 10: 499–503.
- Bray, F., Ren, J.-S., Masuyer, E., dan Ferlay, J., 2013. Global Estimates of Cancer Prevalence for 27 Sites in the Adult Population in 2008. *International Journal of Cancer*, 132: 1133–1145.
- Endang H. T., Sukma D. H. 2016. Methanolic Extract of *Moringa oleifera* Reduces Serum TNF- α , IL-6, and Colonic Tissue MDA Levels in DMBA-induced Wistar Rats. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 29(1):25-31.
- Erika, B.R., Marita, D., dan Rini, S. 2014. Aktivitas Penangkapan Radikan DPPH oleh Fraksi n-heksana dan Fraksi Etil Asetat daun Kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) *Media Farmasi*. 11(1):1-6.
- Fitriana, W. D., Fatmawati, S. dan Ersam, T. 2015. *Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH dan ABTS dari Fraksi-fraksi Daun Kelor (Moringa oleifera)*. Prosiding Simposium Nasional Inovasi dan Pembelajaran Sains, FMIPA ITB, Bandung :657-660.
- Green, S. Pattie., and Leeuwenburgh., 2002., Mitochondrial dysfunction is an early indicator of doxorubicin-induced apoptosis., *Biochimica et Biophysica Acta*,1588(1): 94-101

- Hermawan, A., Nur, K.A., Sarmoko, Dewi, D., Putri, p. dan Meiyanto, E. 2012. Ekstrak Etanol daun kelor dapat meningkatkan Efek Doksorubisin pada sel kanker Hela, *Journal of Natural remedies*, 12(2):08-114.
- Oemiati, R., Rahajeng E., Kristanto, A. Y.i., 2011. Prevalensi Tumor dan Beberapa Faktor yang mempengaruhinya di Indonesia., *Buletin Penelitian Kesehatan*, 39(4) : 190-204
- Ozyurt D, Demirata B, Apak R. 2006. Determination of total antioxidant capacity by a new spectrophotometric method based on Ce (IV) reducing capacity measurement. *Talanta*. 24: 273-282.
- Rajkumar, T, Yamuna, M., 2008. Multiple Pathways are Involved in Drug Resistance to Doxorubicin in an Osteosarcoma Cell Line. *Anti-Cancer Drugs*, 19: 257–265.
- Rode, H. J., 2008. *Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation*, 4th ed. Roche Diagnostics GmbH.
- Shahriar, M. 2012, Aktivitas antioksidan in vitro dari daun kelor, *S. J. Pharm. Sci*. 5 (1&2): 41-52.
- WHO, 2017. 10 Fact on Cancer. <http://www.who.int/features/factfiles/cancer/en/>
- WHO, 2013. Latest World Cancer Statistics Global Cancer Burden Rises to 14.1 Million New Cases in 2012. Internasional Agency for Research on Cancer. Cancer Base no.11. Lyon France. <http://globocan.iarc.fr>

EFEK SITOTOKSISITAS DAN SELEKTIVITAS FRAKSI AKTIF EKSTRAK DAUN KELOR (*Moringa oleifera* Lamk.) TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D

ORIGINALITY REPORT

21 %

SIMILARITY INDEX

18 %

INTERNET SOURCES

11 %

PUBLICATIONS

3 %

STUDENT PAPERS

MATCH ALL SOURCES (ONLY SELECTED SOURCE PRINTED)

3%

★ repositori.usu.ac.id

Internet Source

Exclude quotes On

Exclude matches Off

Exclude bibliography On

EFEK SITOTOKSISITAS DAN SELEKTIVITAS FRAKSI AKTIF EKSTRAK DAUN KELOR (Moringa oleifera Lamk.) TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D

GRADEMARK REPORT

FINAL GRADE

/25

GENERAL COMMENTS

Instructor

PAGE 1

PAGE 2

PAGE 3

PAGE 4

PAGE 5

PAGE 6

PAGE 7

PAGE 8
