

BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Penyiapan Bahan Tanaman

1. Determinasi tanaman

Determinasi dilakukan di Laboratorium Morfologi Sistemika Tumbuhan Universitas Sebelas Maret Surakarta. Berdasarkan hasil determinasi tanaman bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis). Deskripsi lengkap dari tanaman binahong dapat dilihat pada Lampiran 1.

2. Pengumpulan simplisia, pengeringan simplisia, dan pembuatan ekstrak

Daun binahong yang dipilih adalah daun yang segar. Daun binahong dicuci bersih, selanjutnya dilakukan pengeringan. Suhu yang terlalu rendah tidak akan mengeringkan dengan sempurna, akibatnya sampel akan cepat membusuk, sedangkan suhu yang terlalu tinggi akan merusak senyawa yang terkandung dalam tanaman tersebut. Pengeringan dengan oven ini untuk mencegah tumbuhnya bakteri dan jamur serta perubahan kimiawi. Daun binahong yang sudah kering selanjutnya diserbuk dan diayak, bertujuan untuk memperluas permukaan partikel bahan yang kontak dengan pelarut saat ekstraksi sehingga meningkatkan kontak antara pelarut dan bahan agar ekstraksi lebih optimal.

Data rendemen berat daun binahong kering terhadap daun binahong basah ditunjukkan pada Tabel 1 dan perhitungan lengkap rendemen daun kering dapat dilihat pada Lampiran 4.

Tabel 1. Rendemen berat daun kering terhadap berat daun basah		
Berat basah (g)	Berat kering (g)	Rendemen (%)
10000	1000	10

3. Organoleptis serbuk daun binahong

Serbuk daun binahong dilakukan uji organoleptis yang meliputi: bentuk, warna, rasa, dan bau. Hasil uji organoleptis ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji organoleptis serbuk daun binahong

Pengujian	Hasil
Bentuk	Serbuk
Warna	Hijau kecoklatan
Rasa	Pahit
Bau	Khas

4. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun binahong

Tujuan penetapan susut pengeringan ini untuk mengetahui bahwa serbuk yang dihasilkan memenuhi standar sesuai dengan yang telah ditetapkan yaitu tidak lebih dari 10 %. Alat yang digunakan untuk menetapkan susut pengeringan serbuk adalah *moisture balance*. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun binahong dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil penetapan susut pengeringan daun binahong

Berat awal (g)	Susut kering (%)
2	7,3
2	6,9
2	8,2
Rata-rata ± SD	7,5 ± 0,666

5. Pembuatan ekstrak etanol daun binahong

Pembuatan ekstrak etanol daun binahong dilakukan dengan metode maserasi dengan menggunakan etanol 70 % berdasarkan (Kemenkes 2013). Etanol 70% digunakan karena pelarut ini diharapkan dapat menarik sebagian besar senyawa aktif dalam simplisia daun binahong. Filtrat yang didapat diuapkan untuk memisahkan dari pelarutnya dilakukan dengan menggunakan *rotarry evaporator*. Prinsip dari *rotary evaporator* adalah penguapan dengan tekanan sehingga dapat terjadi penguapan dibawah titik didih, suhu yang digunakan saat penguapan adalah 50° C. Penguapan menggunakan suhu yang stabil tersebut bertujuan untuk tetap menjaga stabilitas senyawa aktif dari proses pemanasan yang dilakukan dalam jangka waktu yang lama. Hasil yang didapatkan dari *rotary evaporator* ditampung di gelas kaca kemudian dikeringkan lebih lanjut di dalam oven untuk memperoleh ekstrak kental. Rendemen ekstrak dalam penelitian ini menunjukkan hasil sebesar 17,21 % > 11,91 %. Data rendemen ekstrak dapat

dilihat pada Tabel 4 dan hasil pemeriksaan organoleptis ekstrak dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 4. Hasil rendemen ekstrak etanol daun binahong

Berat serbuk (g)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%)
800	137,70	17,21

Tabel 5. Hasil pemeriksaan organoleptis ekstrak etanol daun binahong

Organoleptis	Hasil
Bentuk	Kental
Warna	Hijau
Bau	Khas

6. Uji kadar air ekstrak etanol daun binahong

Pada pengujian kadar air ekstrak etanol daun binahong menggunakan metode *Sterling Bidwell* karena prosesnya relatif cepat dan data yang dihasilkan akurat. Tujuan pengujian ini untuk mengetahui kualitas ekstrak untuk menjamin tidak adanya kontaminasi bakteri dan jamur. Ketetapan kadar air menurut Kemenkes (2011) tidak lebih dari 8,85%. Hasil kadar air ekstrak etanol daun binahong dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil kadar air ekstrak daun binahong

Berat awal (g)	Kadar air (%)
6	8,4
6	6,5
6	6,7
Rata-rata ± SD	7,2 ± 1,044

7. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak etanol daun binahong

Identifikasi kandungan senyawa ekstrak etanol daun binahong dilakukan dengan uji tabung untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung di dalam ekstrak. Identifikasi dilakukan dengan menambahkan ekstrak dengan pereaksi yang sesuai dan diamati perubahannya. Hasil identifikasi dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil identifikasi kandungan senyawa ekstrak etanol daun binahong

Senyawa	Hasil identifikasi	Pustaka	Kesimpulan
Flavanoid	Merah kecokelatan	Merah, jingga, ungu	Positif
Terpenoid	Hijau	Merah/ungu	Negatif
Steroid	Hijau	Hijau/Biru	Positif
Alkaloid	Endapan hijau	Mayer (endapan putih)	Negatif
	Endapan kuning kecokelatan	Wagner (endapan coklat)	Positif
	Endapan merah jingga	Dragendorrf (endapan merah, jingga)	Positif
Tanin	Biru hitam	Biru, biru hitam, hijau	Positif
Saponin	Busa	Busa stabil	Positif

B. Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol Daun Binahong Terhadap Kultur Sel Kanker Payudara T47D

1. Aktivitas sitotoksik ekstrak etanol daun binahong

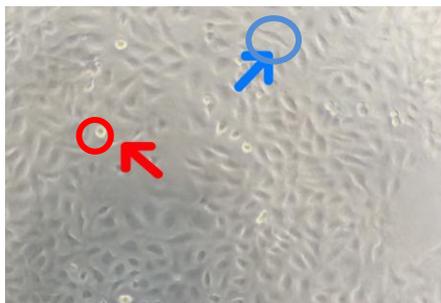
Uji sitotoksik pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya sifat sitotoksik dari ekstrak daun binahong terhadap sel kanker payudara T47D dan selektivitas terhadap sel Vero. Aktivitas sitotoksik dapat diketahui dengan nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} menunjukkan konsentrasi sampel yang dapat menghambat proliferasi sel sebesar 50 % dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Metode sitotoksik yang digunakan adalah MTT *assay* berdasarkan prinsip reduksi MTT menjadi garam formazan saat enzim reduktase dalam keadaan aktif.

Uji sitotoksik metode MTT *assay* dimulai dengan menumbuhkan kultur sel kanker payudara T47D dalam media RPMI dan menumbuhkan sel Vero pada media M199. Media RPMI mengandung streptomisin yang bertujuan untuk menghindari adanya kontaminasi, karena streptomisin merupakan antibiotik spektrum luas yang tidak toksik. Pemanenan sel dilakukan dengan membuang media kultur. Selanjutnya dilakukan pencucian dengan PBS yang bertujuan untuk menghilangkan serum dalam media yang tertinggal karena serum tersebut dapat menghambat kerja tripsin yang akan ditambahkan selanjutnya untuk melepaskan ikatan antara molekul glikoprotein dan proteoglikan dengan permukaan *flask*, sehingga sel akan terlihat mengapung pada permukaan *flask*. Pemanenan sel Vero juga dilakukan sedemikian rupa, namun media yang digunakan adalah M199.

Selanjutnya dilakukan perhitungan sel dengan alat *hemocytometer*, jumlah sel hidup dalam suspensi tersebut adalah $120,25 \times 10^4$ sel/3000 μL untuk sel T47D, sedangkan untuk sel Vero sebanyak $120,75 \times 10^4$. Setelah itu dilakukan pengenceran terhadap suspensi sel kanker payudara T47D dan sel Vero untuk mendapatkan konsentrasi sebesar 10×10^4 sel/mL dan ditambahkan media sampai 10 mL sehingga satu *plate* 96 *well* dapat terisi rata, di mana dalam satu *well* mempunyai konsentrasi 1×10^4 sel/100 μL . Pada jumlah sel tersebut diharapkan sel T47D dan sel Vero dapat bertahan hidup dengan baik dalam inkubasi selama 24 jam.

Perlakuan sampel dilakukan setelah proses inkubasi selama 24 jam. Ekstrak etanol daun binahong dibuat seri konsentrasi (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6) $\mu\text{g/mL}$ dan seri konsentrasi kontrol positif (doxorubisin) yang digunakan (1,56; 0,781; 0,391; 0,195; 0,097) $\mu\text{g/mL}$. Perlakuan pada ekstrak etanol daun binahong dan kontrol positif yang digunakan mengakibatkan adanya perubahan morfologi pada sel kanker payudara T47D.

Sampel dilarutkan dengan pelarut DMSO. Pelarut ini merupakan pelarut yang baik untuk senyawa organik maupun anorganik, dan relatif tidak toksik terhadap sel T47D dan sel Vero. Media kultur dibuang dari *well* kemudian ditambahkan sampel ekstrak dan doxorubisin dengan seri konsentrasi masing – masing sampel, dilakukan replikasi sebanyak 3x. Kontrol negatif berupa sumuran yang hanya diisi sel saja, disebut dengan kontrol sel. Kontrol media hanya berupa pemberian media saja pada beberapa sumuran. Selanjutnya *microplate* diinkubasi selama 24 jam. Tahap selanjutnya adalah MTT, dengan menambahkan larutan MTT ke dalam setiap sumuran, kemudian ditunggu selama 4 jam. Morfologi sel dapat diamati di bawah mikroskop *inverted*. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formazan yang berwarna ungu. Morfologi sel dapat dilihat pada Gambar 7.



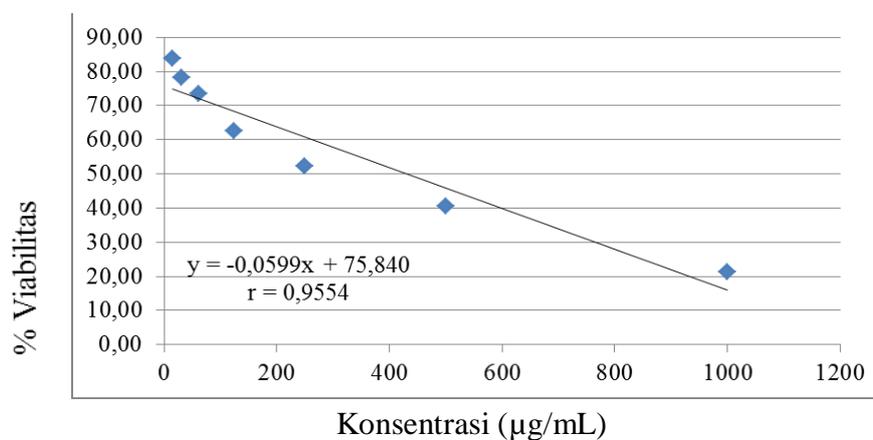
Gambar 7. Morfologi sel T47D pada perbesaran 400x.

(→ sel T47D yang hidup → sel T47D yang mati)

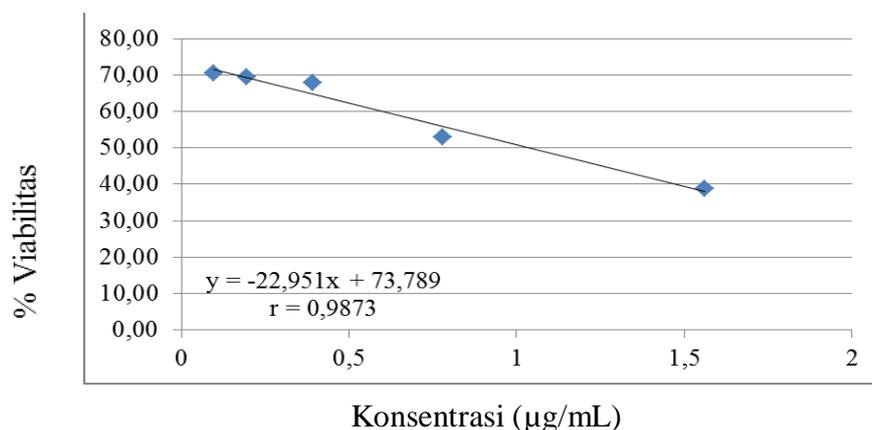
Perubahan yang terjadi berupa kematian sel, akibat apoptosis atau nekrosis. Sel kanker payudara T47D yang mati terlihat mengkerut bulat dan tidak beraturan, sedangkan untuk sel hidup berbentuk lonjong dan terang.

Reaksi MTT menjadi formazan hanya dapat dilakukan oleh sel hidup. Reduksi MTT menjadi garam formazan terjadi jika enzim reduktase dalam keadaan aktif. Terjadi reaksi enzimatik dengan NADH dan NADPH yang dihasilkan oleh sel hidup sehingga terjadi endapan yang tidak larut. Kristal formazan yang terbentuk berbanding lurus dengan sel yang hidup.

Reaksi dihentikan dengan penambahan SDS 10 % dalam HCL 0,1 N, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan pembacaan serapan dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 596 nm. Absorbansi dari setiap sampel akan muncul dan digunakan untuk menghitung % viabilitas (sel hidup). Nilai % viabilitas merupakan kemampuan hidup suatu sel. Pada perhitungan % viabilitas dapat mengetahui jumlah sel yang bertahan hidup setelah terpapar senyawa toksik. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin kecil hasil % viabilitas yang didapatkan. Selanjutnya nilai IC_{50} dihitung terhadap sel T47D dan sel Vero dengan persamaan $y=a+bx$ untuk menentukan konsentrasi ekstrak etanol daun binahong yang menyebabkan penghambatan pertumbuhan sel hingga 50 %. Berikut ini merupakan grafik yang menunjukkan potensi ekstrak etanol daun binahong dan doxorubisin terhadap sel T47D, dapat dilihat pada Gambar 8 dan Gambar 9.



Gambar 8. Grafik hubungan konsentrasi ekstrak etanol daun binahong vs % viabilitas pada sel T47D.



Gambar 9. Grafik hubungan konsentrasi doxorubisin vs % viabilitas sel T47D.

Berdasarkan data di atas nilai IC_{50} ekstrak etanol daun binahong pada penelitian ini ditentukan dengan regresi linier pada 7 seri konsentrasi yang didapatkan persamaan linier $y = 75,840 - 0,0599x$, dengan nilai $r = 0,9554$ berdasarkan persamaan linier ini didapatkan nilai IC_{50} ekstrak sebesar 431,386 $\mu\text{g/mL}$. Pada kontrol positif doxorubisin didapatkan hasil persamaan linier $y = 73,789 - 22,951x$ dengan nilai $r = 0,9873$ berdasarkan persamaan linier ini didapatkan nilai IC_{50} sebesar 1,036 $\mu\text{g/mL}$. Berdasarkan NCI (*National Cancer Institute*) suatu ekstrak dikatakan aktif apabila memiliki aktivitas sitotoksitas ($IC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$); moderat aktif apabila ($30 \mu\text{g/mL} \leq IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$); kurang aktif apabila ($IC_{50} \geq 100 \mu\text{g/mL}$). Sehingga dari kriteria tersebut dapat dinyatakan bahwa ekstrak etanol daun binahong pada penelitian ini menunjukkan aktivitas

sitotoksik kurang aktif terhadap sel kanker T47D. Oleh sebab itu hasil yang didapat berbeda dengan penelitian sebelumnya yaitu pada penelitian Yuliani *et al.* (2015) terhadap sel kanker serviks HeLa, ekstrak etanol daun binahong ditunjukkan dengan IC_{50} 76 $\mu\text{g/mL}$. Perbedaan hasil tersebut dapat disebabkan oleh perbedaan ekspresi beberapa protein yang berperan dalam proses apoptosis pada jenis kanker yang berbeda. Nilai IC_{50} ekstrak etanol daun binahong yang tinggi ini diduga karena berbagai faktor yang mempengaruhi, seperti kompleksitas senyawa yang terkandung di dalam ekstrak etanol daun binahong tersebut dapat memungkinkan mempengaruhi aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker. Kadar senyawa flavonoid yang rendah diduga dapat menyebabkan nilai IC_{50} yang cukup tinggi, serta jenis kandungan senyawa flavonoid pada ekstrak etanol daun binahong juga dapat mempengaruhi aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker.

2. Uji indeks selektivitas ekstrak etanol daun binahong

Nilai indeks selektivitas menunjukkan tingkat keamanan dari ekstrak terhadap sel kanker dan sel normal, yang dihitung dengan membandingkan nilai IC_{50} ekstrak terhadap sel normal (sel Vero) dan IC_{50} ekstrak terhadap sel kanker payudara T47D. Ekstrak dikatakan memiliki selektivitas yang tinggi apabila nilai indeks selektivitasnya > 3 (Prayong *et al.* 2008).

Tabel 8. Nilai indeks selektivitas

BAHAN	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		IS
	SEL VERO	SEL T47D	
Ekstrak etanol daun binahong	1529,978	431,386	3,547
Doxorubisin	2,883	1,037	2,780

Berdasarkan Tabel 8 menunjukkan bahwa nilai indeks selektivitas ekstrak etanol daun binahong dinyatakan memiliki tingkat selektivitas yang tinggi dalam menghambat pertumbuhan sel, artinya ekstrak etanol daun binahong tersebut memiliki potensi sitotoksik terhadap sel kanker tetapi juga memiliki tingkat keamanan yang tinggi terhadap sel normal. Namun, pada obat doxorubisin menunjukkan nilai indeks selektivitas yang rendah, artinya doxorubisin memiliki potensi sitotoksik terhadap sel kanker tetapi tingkat keamanannya rendah terhadap sel normal. Hal ini dapat disebabkan efek samping dari obat doxorubisin yang bersifat toksik terhadap sel normal.