BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*) dalam menghambat migrasi sel kanker kolon WiDr secara in vitro. Hasil penelitian ini dapat tercapai dengan rangkaian penelitian meliputi uji sitotoksik ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*) pada sel WiDr dengan menggunakan metode MTT assay dan uji migrasi menggunakan *scratch wound healing assay.*

A. Uji Sitotoksik menggunakan MTT *Assay*

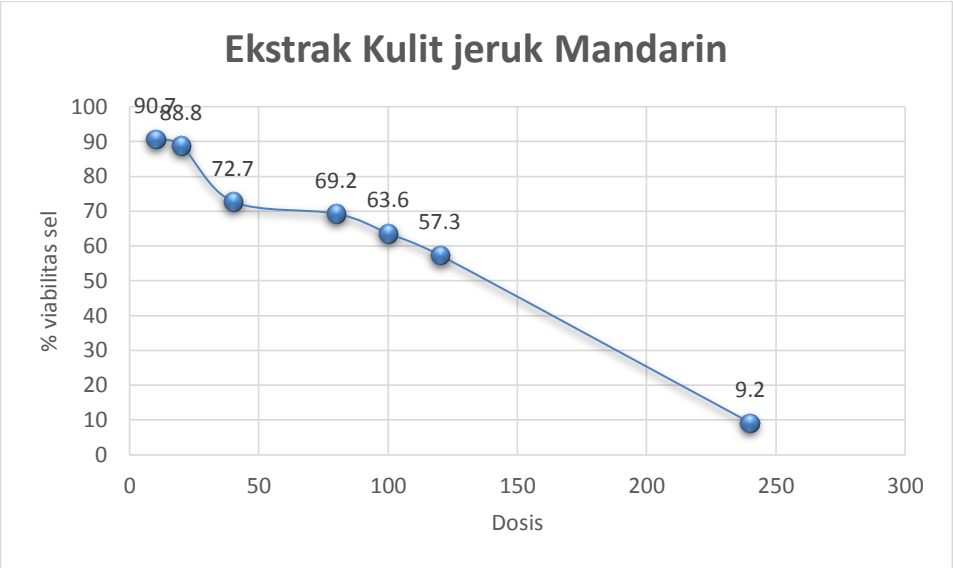
Sel kanker kolon WiDr yang akan diuji sitotoksik harus konfluen 80% karena jika jumlah sel terlalu sedikit, sel akan mati akibat perlakuan sampel. Media yang digunakan untuk penanaman sel WiDr adalah RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) yang telah terstandarisasi. Sedangkan ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin menggunakan pelarut aquades dan DMSO 1%. Pelarut DMSO (dimetil sulfoksida) merupakan pelarut yang mampu melarutkan senyawa polar atau non polar dan tidak bersifat sitotoksik (BPOM R1, 2010). Kadar DMSO yang digunakan pada uji sitotoksik sebesar 1% yang dilarutkan menggunakan aquades, hal ini sesuai dengan Purwaningsih *et al.* (2014) yang menyatakan bahwa DMSO dengan kadar kurang dari 3% tidak bersifat toksik pada sel kanker sehingga dapat digunakan sebagai kontrol pelarut.

Penelitian uji sitotoksik ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin terhadap viabilitas sel WiDr dilakukan menggunakan metode MTT. Prinsip metode MTT adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-

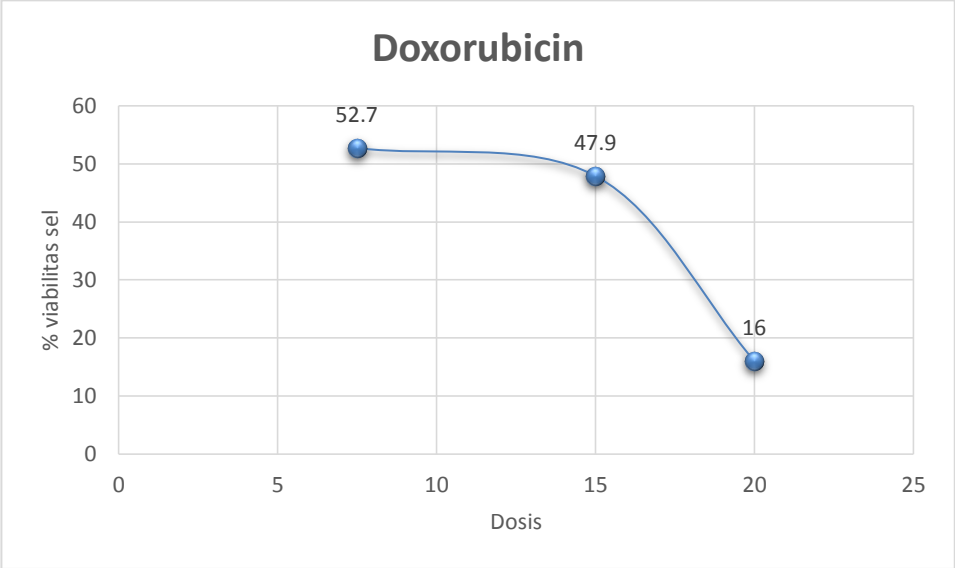
difeniltetrazolium bromida) menjadi kristal formazan warna ungu oleh enzim suksinat dehidrogenase akibat aktivitas metabolik seluler oleh NAD(P)H-dependent enzim seluler oksireduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria (Berridge *et al.*, 2005). Reaksi antara MTT dengan enzim reduktase suksinat tetrazolium merupakan reaksi enzimatis yang berlangsung terus-menerus sehingga diperlukan larutan *stopper* (SDS 10% dalam HCL 0,01 N) untuk menghentikan reaksi tersebut. Kristal formazan ungu yang larut dalam SDS kemudian diukur absorbansinya menggunakan ELISA reader dan dihitung viabilitas sel menggunakan rumus sebagai berikut

$$\frac{(\textit{Absorbansi perlakuan-Absorbansi kontrol media})}{(\textit{Absorbansi kontrol sel-Absorbansi kontrol media})} \times 100\%$$

Hasil dari perhitungan tersebut disajikan dalam bentuk grafik % viabilitas sel (CCRC, 2013).



Gambar 8. Grafik persen viabilitas sel WiDr yang diberi ekstrak kulit jeruk Mandarin



Gambar 9. Grafik persen viabilitas sel WiDr yang diberi doxorubicin

Berdasarkan grafik tersebut, aktivitas ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin menunjukkan pola *dosedependent*, yaitu viabilitas sel berkurang seiring bertambahnya konsentrasi ekstrak. Data persen viabilitas sel dihitung IC50nya menggunakan persamaan regresi linier menggunakan software SPSS 15 pada 7 titik konsentrasi yaitu dosis 10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL, 80 µg/mL, 100 µg/mL, 120 µg/mL, dan 240 µg/mL sehingga didapatkan persamaan linear y= a+bx. Koefisien y pada persamaan linier menunjukkan IC_{50}, sedangkan koefisien x menunjukkan konsentrasi ekstrak yang akan dicari nilainya, dimana x yang diperoleh merupakan besarnya konsentrasi yang diperlukan untuk dapat menghambat viabilitas sel sebesar 50%. Sehingga, untuk mencari nilai IC_{50}, dimasukkan nilai y sebesar 50, sehingga persamaan menjadi 50 = 77.892-2.755x.

Berdasarkan persamaan linear tersebut didapatkan nilai IC_{50} ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin sebesar 129.5 µg/ml yang termasuk sitotoksik moderat.

Sitotoksisitas dikelompokkan menjadi tiga yaitu (1) Sitotoksik potensial jika IC_{50}< 100 μg/ml, (2) sitotoksik moderat jika 100 μg/ml<IC_{50}<1000μg/ml, dan (3) tidak toksik jika IC_{50}> 1000 μg/ml. Kelompok senyawa dengan sitotoksik potensial dapat digunakan sebagai agen antikanker (Tussanti, 2014). *National Cancer Institute* (NCI) mengelompokkan suatu senyawa tergolong antikanker jika IC_{50}<20 μg/ml. Sedangkan ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin yang tergolong senyawa dengan sitotoksik moderat dapat digunakan sebagai kemoprevensi yang dapat mencegah dan menghambat pertumbuhan sel kanker (Prayong, 2008).

Nilai IC_{50} ekstrak etanol kulit jeruk mandarin juga dibandingkan dengan nilai IC_{50} doxorubicin pada sel WiDr yaitu 10.124 μg/ml. Sesuai *National Cancer Institute* (NCI), IC_{50} doxorubicin termasuk sitotoksik potensial atau senyawa antikanker karena IC_{50}<20 μg/ml. Dari hasil penelitian ini, dapat diketahui bahwa ekstrak etanol kulit jeruk mandarin mempunyai aktivitas sitotoksik lebih rendah daripada doxorubicin, namun tergolong senyawa dengan sitotoksik moderat.

B. Uji Migrasi Menggunakan *Scratch Wound Healing Assay*

Metode *scratch wound healing assay* adalah sebuah metode yang mudah, murah, dan dikembangkan dengan baik untuk mengukur migrasi sel secara in vitro (Liang *et al*., 2007). Prinsip dasar dalam metode ini dimulai dengan membuat goresan pada sel monolayer menggunakan *yellow tip* steril sehingga terbentuk celah dengan ukuran tertentu. Penentuan kemampuan migrasi sel dilakukan dengan mengamati sel dengan mengambil gambar secara berkala selama proses migrasi sel berlangsung dari jam ke-0 dan pada interval waktu yang

ditentukan. Langkah selanjutnya adalah membandingkan gambar untuk mengukur tingkat migrasi sel. (CRCC, 2015).

Pengujian migrasi sel WiDr dilakukan menggunakan metode *scratch wound healing assay* yang diamati di bawah mikroskop *inverted* secara berkala dengan interval waktu 12 jam yaitu pada jam ke-0, 12, 24, dan 36. Dosis ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin yang digunakan pada uji migrasi didasarkan pada nilai IC_{50} pada uji sitotoksik. Pada uji migrasi digunakan dosis di bawah IC_{50}, karena dosis di atas IC_{50} akan bersifat toksik pada sel kanker, sedangkan pada uji migrasi diharapkan ekstrak dapat memperlambat kemampuan migrasi sel, namun tidak mematikan sel atau bersifat toksik. Sehingga, dosis ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin yang digunakan pada penelitian ini adalah 1/8 IC_{50}, ¼ IC_{50}, 1/3 IC_{50}, ½ IC50, dan IC_{50}. Sedangkan sebagai kontrol sel negatif adalah sel WiDr tanpa perlakuan, dan kontrol positif adalah doxorubicin dengan dosis IC_{50}.

Hasil pengamatan migrasi sel WiDr setiap 12 jam di bawah mikroskop *inverted* diambil gambarnya. Gambar migrasi yang didapatkan kemudian diolah menggunakan software *ImageJ* yang telah banyak digunakan sebagai *software* penghitung migrasi sel. Hasil yang didapatkan berupa luas area migrasi tiap perlakuan yang kemudian dihitung persen penutupan sel atau persentase migrasi menggunakan rumus

$$\frac{\text{(Luas area jam ke-0 - Luas area jam ke-x)}}{\text{Luas area jam ke-0}} \times 100\%$$

Berdasarkan hasil perhitungan, didapatkan persentase penutupan sel (%migrasi) sebagai berikut

Tabel 2. Persentase penutupan sel WiDr (%migrasi)

Jam ke	Kontrol	Doxorubicin	1/8 IC50	1/4 IC50	1/3 IC50	1/2 IC50	IC50
12	11.6	8.4	13.9	15	6.7	7	6
24	19.9	12.7	22.4	29.8	16	13.9	7.7
36	28.8	21	36.1	45.3	25.9	17.9	36.1

Tabel 3. Interval presentase penutupan sel WiDr

Interval antar jam	Kontrol	Doxorubicin	1/8 IC_{50}	1/4 IC_{50}	1/3 IC_{50}	1/2 IC_{50}	IC_{50}
12-24	8.3	4.3	8.5	14.8	9.3	6.9	1.7
24-36	8.9	8.3	13.7	15.5	9.9	4	28.4

Berdasarkan tabel 3, dapat dilihat bahwa daya hambat migrasi terbesar pada ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*) dosis ½ IC_{50} atau 64.75 μg/ml dengan interval penurunan presentase sel yang mengalami rentang terbesar yaitu dari 6.9% menurun menjadi 4%. Sedangkan, pada doxorubicin dosis IC_{50} sebagai kontrol positif dan pada ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*) dosis IC_{50} interval presentase penutupan sel WiDr cenderung mengalami peningkatan. Hal ini berarti pada dosis IC_{50}, senyawa tidak berpotensi menghambat migrasi sel, namun berpotensi toksik yang terlihat pada hasil uji sitotoksik Doxorubicin dan ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin yang berpengaruh toksik pada sel WiDr. Dosis ¼ IC_{50} dan dosis 1/3 IC_{50} menunjukkan interval presentase penutupan sel WiDr yang signifikan atau dapat dikatakan pada dosis tersebut tidak adekuat dalam menghambat migrasi sel WiDr secara in vitro. Pada dosis 1/8 IC_{50}, terdapat peningkatan interval presentase penutupan sel yang berarti pada dosis 1/8 IC_{50} tidak dapat menghambat migrasi sel WiDr secara in vitro.

Interval presentase penutupan sel WiDr sangat bervariasi, ada hasil persentase yang cenderung signifikan, mengalami penurunan, atau mengalami peningkatan.

Hal ini tentunya dipengaruhi oleh berbagai faktor. Berbagai faktor di dalam sel kanker yang meningkatkan migrasi, diantaranya yang disebut *autocrine motility factor*. Sel kanker menjadi infiltratif apabila mempunyai kemampuan untuk menembus ke dalam saluran limfe dan saluran darah. Ini merupakan permulaan dari proses migrasi sel (Bosman, 1999). *Autocrine motility factor* (AMF) merupakan suatu glikoprotein 60-kD yang dihasilkan oleh human melanoma cells yang menstimulasi migrasi sel. Autotaxin (ATX) merupakan suatu agent autocrine motilitas lainnya yang dapat menyebabkan respon kemotaktik dan kemokinetik pada human melanoma cells. Identifikasi terhadap AMF dan ATX menimbulkan dugaan bahwa stimulasi pergerakan sel tumor terjadi sebagai respon terhadap mekanisme autocrine (Lumongga, 2008).

Faktor di luar sel kanker yaitu faktor lingkungan mikro juga mempengaruhi migrasi sel. Lingkungan mikro salah satunya terdiri atas campuran molekul-molekul matriks ekstraseluler (ECM) yang memegang peranan dalam angiogenesis. Matriks ekstraseluler memiliki struktur yang menunjang penancapan sel kanker ke jaringan sekitar dan secara homeostasis memediasi komunikasi antar sel. ECM dan membran basal merupakan sumber inhibitor angiogenesis endogen, misalnya endostatin (Bosman, 1999). Sel kanker dapat juga terpapar pada stress lingkungan termasuk pH rendah, *reactive oxygen species* (ROS), dan mediator inflamasi. Stres tersebut dapat menyebabkan terjadinya seleksi sel-sel kanker yang memiliki kemampuan tetap tumbuh menghadapi tantangan tersebut dan mengalami proses perubahan menjadi fenotip agresif (Kurniawan, 2014). Misalnya hipoksia menstabilkan HIF

(*hypoxia inducible factor*, HIF-1) yang merupakan aktivator angiogenik yang merangsang ekspresi gen yang memberi respons terhadap hipoksia (hypoxia responsive genes), misalnya gen yang menyandi enzim glikolitik seperti aldolase-A, enolase, dan LDH-A. Dalam kelompok ini juga termasuk VEGF (*vascular endothelial growth factors*) yang merupakan faktor pertumbuhan endotel yang mendukung pembentukan pembuluh darah (angiogenesis) yang merupakan proses yang menginisiasi migrasi sel (Kresno, 2011).

Data migrasi sel WiDr yang diberi ekstrak kulit jeruk Mandarin pada beberapa dosis perlakuan dilakukan uji normalitas untuk melihat data tersebut normal atau tidak. Selain itu, data tersebut kurang dari 50 sampel, sehingga uji normalitas yang digunakan yaitu Saphiro Wilk, yang ditampilkan dalam tabel berikut.

Tabel 4. Uji Normalitas

	Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.
Kontrol	.994	4	.978
Doxorubicin	.999	4	.996
1/8 IC50	1.000	4	1.000
1/4 IC50	.994	4	.976
1/3 IC50	.983	4	.917
1/2 IC50	.972	4	.855
IC50	.810	4	.121
3/2 IC50	.939	4	.650

Dari tabel uji normalitas, didapatkan nilai p> 0.05 yang berarti data terdistribusi normal. Selanjutnya, data terdistribusi normal maka dianalisis menggunakan uji parametrik yaitu *One way ANOVA* karena pada penelitian ini

sampel terdiri dari beberapa kelompok yang berbeda. Hasil uji *One way ANOVA* ditampilkan dalam tabel berikut

Tabel 5. Test Homogeneity of Variances

Dosis

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.621	7	24	.177

Tabel 6. ANOVA

Dosis

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5658642957840599.000	7	808377565405799.800	3.457	.011
Within Groups	5612603512302399.000	24	233858479679266.620		
Total	1127124647014300 0.000	31			

Dari hasil uji homogenitas, diketahui nilai signifikansi (p-value) 0.177 yang berarti p> 0.05, sehingga menunjukkan persebaran data homogen. Hasil uji *One way ANOVA* akan muncul bersamaan dengan uji Homogentitas varian yang diperoleh nilai signifikansi (p-value) 0.011 yang berarti p<0.05. Hal ini menunjukkan bahwa keputusan yang diambil adalah menerima H1 yaitu ada perbedaan hasil uji migrasi yang berarti ada pengaruh pemberian ekstrak etanol kulit jeruk Mandarin (*Citrus reticulata*) dalam menghambat migrasi sel kanker kolon WiDr secara in vitro.

Hal ini sesuai dengan beberapa penelitian sebelumnya bahwa terdapat senyawa-senyawa yang dapat menghambat migrasi, beberapa diantaranya dari golongan flavonoid yang memiliki sifat antikanker (Nijveldt *et al*., 2001). Kulit jeruk Mandarin mengandung *polyhydroxyl flavonoid* (PHFs) seperti hesperidin, neohesperidin, dan naringin, dan hampir satu-satunya sumber

polymethoxyflavones (PMFs) dengan kandungan tinggi, terutama diwakili oleh nobiletin, tangeretin, sinesetin, 3,5,6,7,8,3’,4’-heptamethoxyflavone, dan 3,5,6,7,3’,4’-hexamethoxyflavone (Rawson *et al*., 2014).