BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

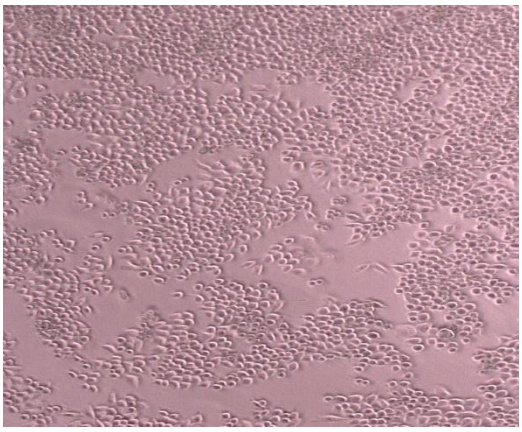
A. Hasil Ekstraksi Daun Teh Hitam (*Camellia sinensis*)

Ekstrak kental yang diperoleh dari ½ kg serbuk daun teh hitam (*Camellia sinensis*) yang di ekstraksi berturut – turut dengan pelarut etanol adalah 10 g ekstrak kental.

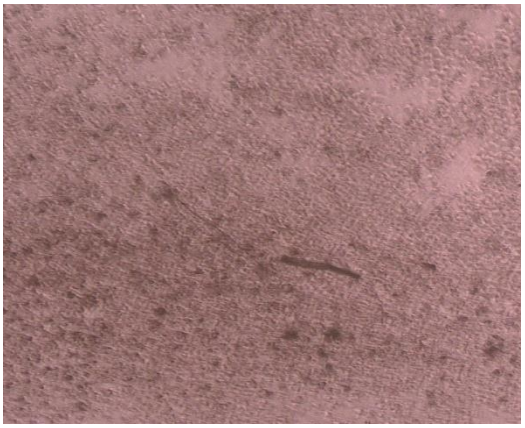
B. Uji Aktivitas Sitotoksisitas

Sebelum di lakukan uji sitotoksik, peneliti harus mempersiapkan sel terlebih dahulu. Sel harus *confluence* 80% jika terlalu rendah dikhawatirkan seluruh sel akan mati akibat perlakuan sampel bahkan dalam konsentrasi rendah absorbansi yang di dapatkan tidak valid. Media yang digunakan adalah RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*). Hasil uji sitotoksisitas menunjukkan bahwa perlakuan ekstrak etanol daun teh hitam (*Camellia sinensis*) memberikan pengaruh terhadap morfologi sel WiDr. Sel yang hidup tampak berbentuk panjang dan melekat di dasar sumuran (Gambar 4), sedangkan sel yang mati berbentuk bulat kecil dan mengapung di sumuran. Pemberian ekstrak etanol daun teh hitam (*Camellia sinensis*) terhadap sel WiDr juga memberikan hasil berupa penurunan sel hidup seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak (Gambar 5). Pada perlakuan ekstrak dengan konsentrasi 80, 160, 320 dan 500 μg/ml, setelah perlakuan di dapatkan hasil viabilitas sel (jumlah sel yang hidup berturut-turut) adalah 100%, 98%, 93%, dan 60%. Hal tersebut menunjukkan fenomena *dose dependent*. Semakin tinggi konsentrasi, semakin kecil jumlah sel yang hidup. Sebaliknya, semakin rendah konsentrasi,

semakin tinggi jumlah sel yang hidup. Pada penelitian ini uji ekstrak ethanol daun teh hitam (*Camellia sinensis*) akan di bandingkan dengan kontrol negatif yang berisi hanya sel kanker WiDr dan kontrol positif doxorubicin sebagai obat standar anti kanker.

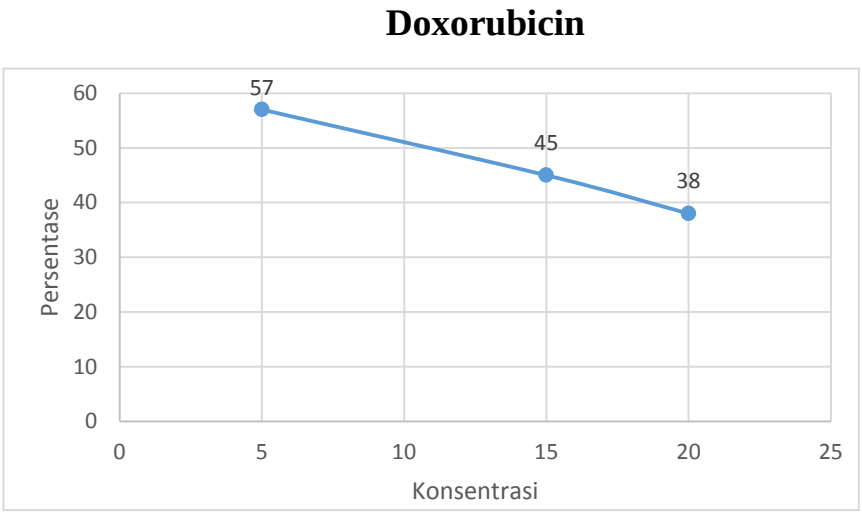


Gambar 6. Sel Kanker Kolon WiDr Hidup



Gambar 7. Sel Kanker Kolon WiDr Mati

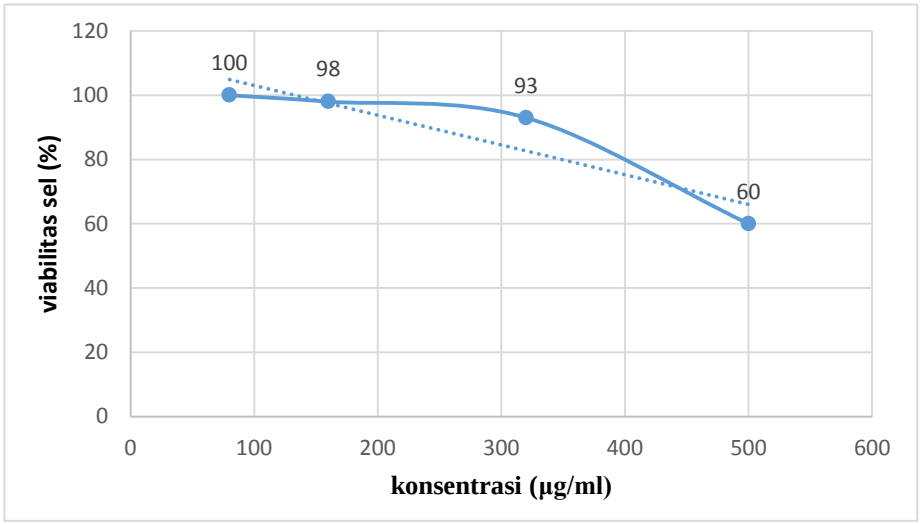
Nilai IC_{50} dihitung dengan regresi linier menggunakan *software* SPSS 15.0. Berdasarkan analisis data konsentrasi ekstrak etanol daun teh hitam (Camellia *sinensis*) dan viabilitas sel diperoleh nilai IC_{50}. Nilai IC_{50} menunjukkan konsentrasi yang dibutuhkan untuk dapat menghambat pertumbuhan sel kanker kolon WiDr sebesar 50% dari total populasi



Gambar 8. Diagram Garis Doxorubicin

Setelah mendapat kurva baku yang grafik dimasukkan 50 sebagai nilai Y untuk mencari nilai IC_{50} doxorubicin sebagai pembanding kontrol positif adalah 16,4700 nM.

EKSTRAK DAUN TEH HITAM (*Camellia sinensis*)



Gambar 9. Diagram Garis Ekstrak Daun Teh Hitam

Setelah mendapat kurva baku yang sesuai (Gambar 7) dimasukkan 50 sebagai nilai Y untuk mencari nilai IC_{50} ekstrak ethanol daun teh hitam adalah 669,53 μg/mL.

Uji sitotoksisitas ekstrak etanol daun teh hitam (*Camellia sinensis*) terhadap sel kanker kolon WiDr dilakukan dengan menggunakan metode MTT. Penggunaan metode uji MTT dikarenakan metode ini sensitif, kuantitatif, dan terpercaya yang digunakan untuk mengukur aktivitas metabolit kultur sel *in vitro* berdasarkan reaksi pembentukan Kristal formazan yang berwarna ungu. Prinsip dari metode ini adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT oleh enzim suksinat tetrazolium reduktase yang terdapat pada mitokondria sel hidup membentuk kristal formazan yang berwarna ungu dan tidak larut dalam air. Intensitas warna ungu yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel hidup. Semakin tinggi intensitas warna ungu, semakin banyak jumlah sel yang hidup dan semakin rendah intensitas warna ungu, semakin sedikit pula jumlah sel yang hidup (Mosmann, 2012).

Berdasarkan nilai IC_{50} yang diperoleh dari uji sitotoksisitas yaitu 669,53 μg/mL, maka ekstrak etanol daun teh hitam (*Camellia sinensis*) dikatakan memiliki potensi sebagai senyawa sitotoksik pada sel kanker kolon WiDr karena IC_{50} yang diperoleh kurang dari 1000 μg/mL (*Caesananda, 2018*). Tetapi suatu ekstrak bisa dikatakan memiliki potensi sitotoksik terhadap sel apabila memiliki IC_{50} kurang dari 100 μg/mL (*Prayong et al.,* 2008). Semakin kecil nilai IC_{50} suatu senyawa, maka senyawa tersebut semakin poten karena hanya membutuhkan dosis kecil untuk dapat memberikan efek sitotoksik.

Sebaliknya, semakin besar nilai IC_{50} suatu senyawa, maka semakin kecil tingkat kepotenannya karena membutuhkann dosis yang besar untuk dapat memberikan efek (Weerapreeyakul, *et al., 2012*). Kelompok senyawa dengan sitotoksisitas potensial dapat digunakan sebagai agen antikanker sedangkan moderat dapat dimanfaatkan untuk komprevensi yang dapat mencegah dan menghambat pertumbuhan sel kanker (*Tussanti*, 2015). Dari penelitian ini dapat diketahui bahwa senyawa yang ada pada daun teh hitam (*Camellia sinensis*) mengandung anti kanker dengan golongan senyawa flavonoid (*Rahayu*, 2015).

C. Uji Scracth Wound Healing

Metode *Scracth Wound Healing* merupakan metode *in vitro* untuk pengamatan migrasi sel yang sederhana dan mudah dilakukan (CCRC, 2015). Prinsip dari metode ini adalah membuat celah buatah (*scratch*) yang telah dibuat (Wang et al, 2012). Kemudian dilakuka pengambilan gambar pada waktu awal dan beberapa rentang waktu tertentu dan membandingkan gambar untuk menentukan nilai migrasi (Haryanti, *et al.*, 2017).

Pengujian migrasi sel dilakukan dengan menggunakan metode *in vitro scratch assay* yang diamati pada jam ke 12, 24, dan 36 setelah perlakuan. Dosis eksrak ethanol daun teh hitam yang digunakan adalah 1/8 IC50, ¼ IC50, 1/3 IC50, ½ IC50, IC50 kemudian dibandingkan dengan kontrol sel dan doxorubicin sebagai obat standar anti kanker. Analisis persentase migrasi dilakukan dengan menggunakan program *ImageJ* berdasarkan perbedaan jarak goresan awal dengan jarak area yang kosong. Persen penutupan tiap

perlakuan pada jam ke 12, 24, dan 36 kemudian dibandingkan dengan kontrol sel dan doxorubicin. Dan hasil migrasi ditampilkan dalam bentuk diagram batang berikut.

Tabel 2. Hasil Persentase Migrasi Sel WiDr

Waktu	Kontrol	Doxorubicin	dosis 1/8 IC 50	dosis ¼ IC 50	dosis 1/3 IC 50	dosis ½ IC 50	dosis IC 50
jam ke-12	24,3%	8,4%	16,5%	19,2%	16,3%	20,9%	14,3%
jam ke-24	28,9%	12,7%	24%	30,6%	19,3%	23,9%	23,5%
jam ke-36	34%	21%	42,2%	56,3%	24,3%	28%	30,9%

Berdasarkan tabel 2.1 Hasil Persentase Migrasi ekstrak daun teh hitam (*Camellia sinensis*) mempunyai daya hambat terbesar pada dosis IC_{50} dilihat dari persentase migrasi yaitu 30,9% di jam ke-36 jika dibandingkan kontrol sel yang memiliki persentase penutupan area yang lebih besar yaitu 34% dan doxorubicin yang memiliki persentase penutupan area yang lebih kecil yaitu 21%. Hal ini dikarenakan ekstrak daun teh hitam mengandung flavonoid yang memiliki aktivitas antikanker.

Interval persentase penutupan sel WiDr sangat berbeda-beda, terdapat hasil penutupan yang cenderung meningkat dan penutupan yang cenderung menutup hal ini disebabkan karena faktor didalam sel kanker yang meningkat mengalami migrasi, diantaranya yang disebut *autocrine motality 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 Motality 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 mekanisme autocrine (Lumongga, 2008).

Tabel 3. Selisih Antar Waktu Tiap Dosis

Waktu	Kontrol	Doxorubicin	dosis 1/8 IC 50	dosis ¼ IC 50	dosis 1/3 IC 50	dosis ½ IC 50	IC 50
Jam ke 24-12	4,60%	4,30%	7,50%	11,40%	3,00%	3,00%	9,20%
Jam ke 36-24	5,10%	8,30%	18,20%	25,70%	5,00%	4,10%	7,40%

Pada saat dibandingkan antar waktu tiap dosis dilihat selisih jam ke-12 sampai jam ke-24 kontrol sebesar 4,60% dan jam ke-24 sampai jam ke-36 kontrol sebesar 5,10% yang berarti pada plate berisi kontrol negatif memiliki aktivitas perjalanan sel yang besar, kemudian dosis doxorubicin pada jam ke-12 sampai jam ke-24 sebesar 4,30% dan jam ke-24 sampai jam ke-36 doxorubicin memiliki nilai sebesar 8,30% yang berarti pada plate yang berisi control positif memiliki aktivitas perjalanan sel yang besar. Dari table 3.1 terdapat dosis IC_{50} ekstrak etanol daun teh hitam (*Camellia sinensis*) yang memiliki aktivitas perjalanan sel sangat kecil sehingga ekstrak pada dosis tersebut dapat menghambat perjalanan sel kanker dibanding kontrol positif doxorubicin dan kontrol negatif yang tidak diberi perlakuan.

Pengolahan data tersebut menggunakan uji normalitas untuk melihat data tersebut normal atau tidak, karena data tersebut kurang dari 50 maka uji normalitas menggunakan Shapiro wilk. Setelah di uji normalitas hasil menunjukkan data tersebut signifikan karena > 0,05.

Tabel 4. Uji Normalitas

Shapiro-Wilk		
Statistic	Df	Sig.
.898	6	.364
.860	6	.189
.953	6	.761
.855	6	.173
.941	6	.671
.886	6	.300
.906	6	.408
.868	6	.220

Tabel 5. Uji Homogenitas

Dosis

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.380	7	40	.241

Kemudian pada saat di uji homogenitas data tersebut memiliki hasil yang sama karena lebih dari 0,05.

Tabel 6. ANOVA

Dosis

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5430167213031815.000	7	775738173290259.200	4.420	.001
Within Groups	7019893103693082.000	40	175497327592327.060		
Total	12450060316724890.000	47			

Uji *One* way *ANOVA* dilakukan untuk membandingkan perbedaan pada masing-masing kelompok. Hasil uji *One* way *ANOVA* pada pemeriksaan jam ke 12, 24, dan 36 menunjukkan perbedaan yang bermakna (p=0,000)

kemudian dilanjutkan dengan menggunakan uji *Post Hoc* untuk melihat perbedaan nyata antar perlakuan.

Peneliti menggunakan metode *scratch assay* untuk mengetahui aktivitas migrasi sel secara *in vitro* karena dianggap dapat menyerupai pemeriksaan migrasi sel pada *in vivo* serta memudahkan dalam mengukur berbagai parameter migrasi seperti kecepatan, polaritas, dan aktivitas signaling intraseluler (Firdaus, 2016) dan menggunakan objek uji berupa kultur sel kanker kolon WiDr.

Beberapa penelitian yang dilakukan untuk mengetahui aktivitas penghambat migrasi senyawa-senyawa tertentu pada ekstrak. Dari senyawa-senyawa yang telah diuji tersebut, beberapa diantaranya adalah senyawa dari golongan flavonoid. Flavonoid memiliki aktivitas antikanker. Sifat anti kanker yang kuat terlihat menghambat migrasi sel (Safdria, *et al*., 2014). Flavonoid dapat menghambat protein tirosin kinase yang memiliki potensi dalam penghambatan migrasi sel angiogenesis (Kumar, 2013).